МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)

INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32429— 2013

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Краткосрочное определение ингибирования ароматазы и эстрогенной и андрогенной активности: 21-дневный тест

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский центр стандартизации, информации и сертификации сырья, материалов и веществ» (ФГУП «ВНИЦСМВ») на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии документа, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 ноября 2013 г. № 61-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Азербайджан	AZ	Азстандарт
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт
Украина	UA	Минэкономразвития Украины

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 22 ноября 2013 г. № 790-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 32429—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2014 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD Test № 230:2009 «Краткосрочное определение ингибирования ароматазы и эстрогенной андрогенной активности: 21-дневный тест» («21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6)

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Октябрь 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© Стандартинформ, оформление, 2014, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Термины и определения . . . 1
3 Основные положения . . . 1
4 Принцип теста . . . 2
5 Критерии достоверности теста . . . 2
6 Описание метода . . . 3
7 Процедура . . . 4
8 Результат и отчет . . . 7
Приложение A (справочное) Условия эксперимента для определения воздействия на эндокринную систему рыб . . . 9
Приложение B (рекомендуемое) Некоторые параметры разбавляющей воды . . . 11
Приложение C (рекомендуемое) Нерестовый субстрат для данио рерио . . . 12
Приложение D (рекомендуемое) Нерестовый субстрат для тупоголового гольяна . . . 13
Приложение E (справочное) Оценка вторичных половых признаков у тупоголового гольяна для обнаружения некоторых веществ, активных по отношению к эндокринной системе . . . 14
Приложение F (справочное) Матрица картографирования бугорков. Цифровая классификация . . . 16
Приложение G (Справочное) Оценка вторичных половых признаков у медаки для обнаружения определенных веществ, воздействующих на эндокринную систему . . . 17
Приложение H (справочное) Рекомендуемые процедуры для типового определения содержания вителлогенина . . . 19
Приложение I (справочное) Усиленные образцы вителлогенина, используемые как эталоны при проведении межлабораторного теста . . . 26
Приложение J (рекомендуемое) Ординограмма статистического анализа . . . 27
Библиография . . . 29

Введение

Разработка и валидация теста на рыбах, позволяющего обнаружить вещества, воздействующие на эндокринную систему, вызваны присутствием в окружающей среде химикатов, которые могут вызвать неблагоприятные эффекты у человека и в дикой природе из-за их взаимодействия с эндокринной системой организма.

21-дневный тест на рыбах для скрининга эндокринных расстройств подвергся обширной программе проверки достоверности, состоящей из межлабораторных исследований с рядом химикатов, для демонстрации актуальности и надежности теста для обнаружения эстрогенов и ароматаз ингибирующих веществ на трех видах рыб [тупоголовый гальян (Pimephales promelas), медака японская (Oryzias latipes) и данио (Danio rerio)]; обнаружение андрогенной активности возможно у гольяна и медаки, но не у данио.

Пробит-тест на воспроизводство рыбы в соответствии с OECD [229] включает подсчет плодовитости и в сжатой форме гистопатологию гольяна, так же как все наблюдаемые параметры, включенные в настоящий стандарт.

OECD [229] позволяет обнаруживать вещества, которые влияют на размножение с помощью различных механизмов, в том числе и эндокринных. Эти различия между двумя методиками должны быть приняты во внимание, чтобы выбрать тот, который наилучшим образом соответствует задачам эксперимента.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩЕЙ ОПАСНОСТЬ ДЛЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Краткосрочное определение ингибирования ароматазы и эстрогенной и андрогенной активности: 21-дневный тест

Testing of chemicals of environmental hazard.
21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition

Дата введения — 2014—08—01

1 Область применения

Настоящий стандарт описывает *in vivo* пробит-тест на группе рыб (состоящей из половозрелых самцов и самок в репродуктивном возрасте), подвергающихся воздействию химиката в период, ограниченный их биологическим циклом (21 день). По завершении 21-дневного периода воздействия в зависимости от подопытного вида измеряют один или два биомаркера у самцов и самок в качестве индикаторов эстрогенной, андрогенной активности или ингибирования ароматазы. Этими биомаркерами являются вителлогенин (VTG) и характеристики вторичных половых признаков. Вителлогенин измеряют у гольяна, японской медаки и данио, тогда как вторичные половые признаки определяются только у гольяна и японской медаки.

Настоящий стандарт не позволяет обнаружить антагонисты андрогенов. Этот тест не предназначен для идентификации конкретных механизмов гормональных разрушений, поскольку подопытные животные обладают здоровой «гипоталамо-гипофизно-гонадной» (ГГГ) осью гормональной регуляции и способны реагировать на вещества, воздействующие на ось ГГГ на различных уровнях.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины с соответствующими определениями:

2.1 **величина загрузки:** Живой вес рыбки в объем воды.

2.2 **вителлогенин фосфолипогликопротеин (VTG):** Предшественник белка желтка яйца, который обычно синтезируется у сексуально активных самок всех яйцекладущих видов.

2.3 **максимальная допускаемая концентрация (МДК):** составляет приблизительно 10 % LC_{50}.

2.4 **ось HPG:** Гипоталамическая гипофизарная гонадальная ось.

2.5 **плотность заселения:** Количество рыбок в объеме воды.

3 Основные положения

3.1 Вителлогенин (VTG) обычно производится печенью самок яйцекладущих позвоночных животных в ответ на циркуляцию эндогенного эстрогена, предшественника белков яичного желтка, который производится печенью и затем переносится кровотоком в яичники, где используется в развитии и изменении ооцитов. Вителлогенин практически не обнаруживаем в плазме незрелых самок и самцов рыб, потому что они испытывают недостаток в эстрогене; однако их печень способна к синтезу и выделению вителлогенина в ответ на экзогенную стимуляцию эстрогена.

3.2 Измерение вителлогенина используется для обнаружения веществ с различными антиэстрогенными свойствами. Обнаружение антиэстрогенных химических веществ возможно через измерение индукции вителлогенина у самцов рыб. Индукция вителлогенина была также продемонстрирована

Издание официальное

после экспонирования ароматизированными андрогенами. Снижение уровня циркулирующих эстрогенов у самок в результате, например, ингибирования ароматазы, фермента, который превращает андрогены в эндогенные эстрогены в естественных условиях (17β-эстрадиол), приводит к снижению уровня вителлогенина, используемого для обнаружения ингибиторов ароматазы. Биологическая значимость реакции вителлогенина в ответ на ингибирование эстрогена/ароматазы установлена и хорошо изучена. Однако производство VTG у самок также может быть изменено токсическим действием веществ, не обладающих эндокринной токсичностью (например, гепатотоксичность).

3.3 Несколько методов измерения были успешно разработаны и стандартизированы для повседневного использования. Это касается конкретных видов иммуноферментного анализа (ИФА), использующихся в иммунохимии методов для количественного определения вителлогенина, синтезированного в малых образцах крови или печени, собранных от отдельных особей рыб. Образцы для измерения VTG отбирают у трех видов: тупоголового гольяна (кровь), данио рерио (кровь или гомогенат) головы/хвоста и медаки японской (печень). У медаки наблюдается хорошая корреляция между концентрацией VTG, измеренной в крови и печени. Наборы для измерения вителлогенина широко доступны; такие наборы должны быть основаны на утвержденном видоспецифичном методе ELISA.

3.4 Вторичные половые признаки у самцов рыб отдельных видов являются вполне различимыми, определяются количественно и реагируют на уровни циркулирующих эндогенных андрогенов в случае толстоголового гольяна и медаки, но не для данио рерио, не обладающего вторичными половыми признаками, которые возможно измерить количественно. Самки обнаруживают способность формировать мужские вторичные половые признаки, когда они подвергаются действию андрогенных веществ в воде. Уменьшение вторичных половых признаков у самцов следует интерпретировать с осторожностью из-за низкой статистической достоверности, и они должны быть подтверждены экспертными оценками и убедительными доказательствами. Существуют ограничения к использованию данио рерио в этом пробит-анализе в связи с отсутствием измеримых вторичных половых признаков, чувствительных к действию андрогенотоксичных веществ.

3.5 У толстоголового гольяна главным индикатором воздействия экзогенного андрогена является количество брачных бугорков, расположенных на передней части головы самки. У медаки главным маркером экзогенного воздействия андрогенов является число папиллярных бугорков у самок рыб.

4 Принцип теста

4.1 В пробит-анализе самцы и самки рыб репродуктивного возраста подвергаются воздействию совместно в тестовых сосудах. Состояние разведения позволяет дифференцировать каждый пол и таким образом связать результаты с анализом каждой конечной точки, что гарантирует их чувствительность к экзогенным химическим веществам. По завершению теста пол подтверждается макроскопическим исследованием гонад после вскрытия брюшной полости ножницами.

Исследование начинают с отбора рыб из поголовья, которое находится в состоянии икрометания; старые животные не должны использоваться. Исследование проводится с использованием трех концентраций воздействия химического вещества, плюс «чистый» контроль и контрольная проба с растворителем, если это необходимо. Используют два параллельных испытания (каждый сосуд, содержит пять самцов и пять самок) для медаки или данио рерио, тогда как для гольяна используют четыре репликации (каждый сосуд, содержит двух самцов и четырех самок). Этот принцип учитывает территориальное поведение самцов тупоголового гольяна, сохраняя при этом достаточную точность анализа. Время экспозиции составляет 21 день, отбор образцов также осуществляется на 21-й день.

4.2 На 21-й день все рыбы подвергаются эвтаназии. Вторичные половые признаки измеряют на толстоголовом гольяне и медаке; отбирают образцы крови для определения вителлогенина у данио рерио и гольяна, альтернативно голова/хвост могут быть отобраны для определения вителлогенина у данио рерио; печень собирают для анализа VTG у медаки.

5 Критерии достоверности теста

Для результатов теста могут быть применены следующие условия:

- смертность в воде (или растворителе) не должна превысить 10 % на момент окончания периода воздействия;

- концентрация растворенного кислорода должна составлять по крайней мере 60 % от концентрации насыщения кислородом воды при температуре эксперимента;

- температура воды не должна колебаться более чем на ± 1,5 °С между тестовыми сосудами в любой момент проведения теста и поддерживаться в пределах диапазона в 2 °С, определенных для тестируемых видов;

- полученные данные должны демонстрировать, что концентрации тестируемого вещества в растворе поддерживаются в пределах ± 20 % от средневзвешенных значений.

6 Описание метода

6.1 Оборудование

Стандартное лабораторное оборудование, в частности:

- кислородомеры и pH-метры;
- оборудование для определения жесткости и щелочности воды;
- надлежащий прибор для контроля температуры, предпочтительно непрерывного действия;
- емкости, выполненные из химически инертного материала и имеющие объем, соответствующий рекомендуемой загрузке и плотности заселения;
- свежий субстрат для тупоголового гольяна и данио рерио;
- весы соответствующего класса точности (± 0,5 мг).

6.2 Вода

Для эксперимента может использоваться любая вода, которая обеспечивает условия долговременного выживания и рост тестовых видов. Она должна иметь постоянные характеристики в течение проведения теста. pH воды должно быть в диапазоне от 6,5 до 8,5, но во время теста это значение должно колебаться в пределах ± 0,5. Чтобы гарантировать, что вода, используемая для разбавления, не будет влиять на результаты эксперимента (например, путем образования комплексов с тестируемым веществом), должны быть взяты пробы воды для анализа. Необходимо каждые три месяца в разбавляющей воде измерять концентрацию тяжелых металлов (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, N и т. д.), основных анионов и катионов (Ca, Mr, Na, K, Cl, SO4 и т. д.), пестицидов (общее содержание фосфор- и хлорорганических веществ), содержание общего органического углерода и сухого остатка для того, чтобы иметь уверенность в том, что вода является относительно постоянной по своему составу. Если существуют доказательства того, что качество воды постоянно в течение года, определения могут быть менее частыми (например, каждые шесть месяцев).

6.3 Тестовые растворы

6.3.1 Тестовые растворы требуемых концентраций готовятся путем разбавления основного раствора. Основной раствор подготавливается путем растворения необходимых веществ в воде с использованием механических средств (например, магнитные или ультразвуковые мешалки). Для получения необходимого концентрированного раствора можно использовать таблицы растворимости. Использование растворителей не рекомендуется. Однако в случае, если это необходимо, нужно отдельно поставить контрольную пробу с растворителем в той же самой концентрации, что и в эксперименте. Выбор растворителя будет определен химическими свойствами вещества. Рекомендуемая максимальная концентрация растворителя 100 мкл/л.

Рекомендуется минимизировать концентрацию растворителя везде, где это технически выполнимо (в зависимости от физико-химических свойств тестируемого вещества).

6.3.2 Может быть использован динамический (проточный) тип эксперимента. Такой тест требует установки системы непрерывного распределения и разбавления основного раствора тестируемого вещества (например, дозаторный насос, пропорциональный разбавитель, система растворения) для обеспечения ряда концентраций в тестовых аквариумах. Объемные скорости потока основных растворов и разбавляющей воды должны проверяться регулярно, предпочтительно ежедневно, во время теста и не должны меняться более чем на 10 % в течение теста. Необходимо с осторожностью использовать низкосортные пластиковые трубки или другие материалы, которые могут содержать биологически активные вещества. Выбирая материал для перекачивающей системы, необходимо учитывать возможную адсорбцию испытательного вещества на этом материале.

6.4 Содержание рыб

6.4.1 Подопытные рыбы должны быть отобраны из лабораторий, предпочтительно из одной лаборатории, которые акклиматизированы в течение по крайней мере двух недель до теста при тех же

условиях качества воды и освещения, которые используются в эксперименте. Важно соблюдать норму заселения в аквариумы для каждого вида рыб.

6.4.2 После 48-часового периода акклиматизации регистрируют смертность по следующим параметрам:

- более чем 10 % смертность выборки через семь дней: исключают из эксперимента всю группу;
- смертность между 5 % и 10 % выборки: акклиматизация в течение семи дополнительных дней; если больше чем 5 % смертность в течение дополнительных семи дней: исключают из эксперимента всю группу,
- смертность меньше 5 % выборки через семь дней: рыбы допускаются к тесту.

6.4.3 Рыбы не должны получать лечение в случае болезни во время периода акклиматизации, в период перед экспозицией или во время теста.

6.5 Предварительная экспозиция и выбор рыб

6.5.1 Рекомендуется недельный период предварительной экспозиции с рыбами, помещенными в емкости, аналогичные реальному тесту. Рыб необходимо хорошо кормить в течение периода акклиматизации и экспозиции. Период экспозиции начинают с отбора взрослых сексуально диморфных особей из лабораторной поставки половозрелых животных (например, с выраженными вторичными половыми признаками, заметными у тупоголового гольяна и медаки), пригодных для разведения. Для ориентира (эти критерии не могут рассматриваться изолировано от фактически наблюдаемого репродуктивного статуса конкретных рыб) тупоголовый гольян должен быть приблизительно (20 ± 2) недельного возраста, при условии что рыбки выращивались при температуре (25 ± 2) °С в течение всей продолжительности жизни. Японская медака должна быть в возрасте приблизительно (16 ± 2) недели, содержащаяся при (25 ± 2) °С в течение всей жизни. Данио рерио должны быть приблизительно в возрасте (16 ± 2) недели при культивировании при (26 ± 2) °С.

6.6 Концепция теста

6.6.1 Три концентрации тестируемого вещества, один контроль (вода) и, если необходимо, один контроль с используемым растворителем. Данные могут быть объектом статистического анализа, позволяющего определить статистически значимые различия между результатами контроля и эксперимента. Статистическая обработка полезна для установления других возможных долгосрочных негативных эффектов (например, выживание, развитие, рост и воспроизводство) вещества.

6.6.2 Для данио и медаки на 21-й день эксперимента в экспериментальных группах каждой тестируемой концентрации (пять самцов и пять самок в каждой из двух повторностей) и в контроле(ях) берут пробы на виллогенин и вторичные половые признаки, где это применимо. Для тупоголового гольяна на 21-й день экспозиции самцов и самок (два самца и четыре самки в каждой из четырех репликаций) и в контроле(ях) берут пробы для измерения вителлогенина и проверки вторичных половых признаков.

6.6.3 Выбор тестовых концентраций

6.6.3.1 Для этого теста самой высокой тестируемой концентрации должна быть максимально допускаемая концентрация (МДК), установленная в ходе предварительного эксперимента или других данных токсичности, или ее принимают равной 10 мг/л, или определяют, исходя из максимальной растворимости в воде, выбирая самую низкую концентрацию. МДК определяют как самую высокую тестовую концентрацию вещества, которая приводит менее чем к 10 % смертности. Использование этого подхода предполагает, что существуют эмпирические данные по острой или другой токсичности, по которым может быть оценена МДК. Оценка МДК может быть неточной и обычно требует некоторого обсуждения.

6.6.3.2 Требуются три тестовые концентрации с постоянным фактором, не превышающим 10, и контроль без вещества (в случае необходимости, и кроме того, контроль с растворителем). Рекомендуется диапазон факторов разбавления между 3,2 и 10.

7 Процедура

7.1 Выбор и взвешивание экспериментальных рыб

Важно минимизировать разброс в весе рыбы в начале теста. Соответствующий диапазон размеров различных видов, рекомендуемых для теста, приведен в приложении А. Для всей партии рыб, используемых в тесте, диапазон весов отдельно для самцов и самок должен находиться по возможности в пределах 20 % от среднеарифметического веса рыбы одного и того же пола. Рекомендуется взвесить подвыборки в партии рыб для оценки среднего веса перед началом эксперимента.

7.2 Условия экспонирования

7.2.1 Продолжительность

Продолжительность теста — 21 день после периода предварительной экспозиции. Рекомендуемый период предварительной экспозиции — одна неделя.

7.2.2 Кормление

7.2.2.1 Рыб необходимо кормить соответствующим кормом в объемах, достаточных для поддержания физической формы. Необходимо соблюдать осторожность, чтобы избежать роста микроорганизмов и помутнения воды. Рекомендуется ежедневную порцию разделить на две или три равных части для многократного кормления в сутки, разделяя каждое кормление по крайней мере трехчасовым промежутком. Корм можно давать одной большой порцией во время выходных дней. Кормление необходимо прекратить за 12 часов до начала выборки/вскрытия животных.

7.2.2.2 Пища рыбы должна быть проверена на наличие загрязняющих примесей, таких как хлорорганические пестициды, полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), полихлорированные бифенилы (ПХБ). Корм с высоким уровнем фитоэстрогенов, который может поставить под угрозу точность анализа, как известные антагонисты эстрогена (например, 17β-эстрадиол), недопустим.

7.2.2.3 Несъеденная пища и фекалии должны удаляться из тестовых емкостей по крайней мере два раза в неделю, например с помощью тщательной очистки дна с помощью сифона.

7.2.3 Свет и температура

Фотопериод и температура воды должны соответствовать требованиям содержания видов.

7.3 Частота аналитических измерений

7.3.1 До начала периода экспозиции должна быть проверена система внесения вещества. Все необходимые аналитические методы должны быть проведены, включая информацию о стабильности вещества в тестируемой среде. Во время теста концентрацию тестируемого вещества определяют через равные промежутки по следующим параметрам: объемные скорости потока растворителя и основного раствора изучаемого вещества. Измерения осуществляют по возможности ежедневно, но не реже чем два раза в неделю, они не должны изменяться более чем на 10 % в течение теста. Рекомендуется измерить фактические концентрации вещества во всех сосудах в начале теста и в еженедельных интервалах после этого.

7.3.2 Рекомендуется обосновывать результаты на измеренных концентрациях. Если концентрация тестового вещества в растворе была удовлетворительно поддержана в пределах ± 20 % от номинальной концентрации в течение всего теста, то результаты могут быть привязаны или к номинальной концентрации, или к измеренным значениям.

7.3.3 При необходимости образцы должны быть отфильтрованы (например, с помощью фильтра с размерами пор 0,45 мкм) или отцентрифугированы. Центрифугирование является предпочтительным. Если тестируемое вещество не адсорбирует на фильтры, фильтрация приемлема.

7.3.4 Во время теста растворенный кислород, температура и pH среды должны измеряться во всех тестовых сосудах по крайней мере раз в неделю. Общая жесткость и щелочность должны измеряться в одном сосуде с самой высокой концентрацией раз в неделю. Температура должна проверяться непрерывно по крайней мере в одном тестовом сосуде.

7.4 Наблюдения

Ряд общих биологических реакций (выживание, например) и целевых тестов (уровни вителлогенина, например) оценивается в ходе или по окончании теста. Количественный контроль плодовитости можно при необходимости проводить ежедневно. Измерения и оценки этих биомаркеров и их полезность описываются далее в данном руководстве.

7.4.1 Выживаемость

Рыбки должны обследоваться ежедневно во время тестового периода, и смертность в этот период должна регистрироваться. Мертвые рыбки должны удаляться как можно скорее. Заменять мертвых рыбок в контроле или в тестовых сосудах нельзя. Пол рыб, которые гибнут во время теста, должен быть определен макроскопической оценкой гонад.

7.4.2 Поведение и внешний вид

7.4.2.1 Любое отклонение в поведении (относительно контроля) должно быть отмечено; это может быть проявлением общей токсичности, включая гипервентиляцию, нескоординированное плавание, потерю равновесия, неподвижность или атипичное кормление. Следует также отмечать любые внешние аномалии (например, кровотечение, изменение цвета). Следует проявлять осторожность при

интерпретации этих признаков токсичности, так как они не являются надежными свидетельствами биомаркеров о потенциальном воздействии на эндокринную систему. Эти наблюдения могут также предоставить качественную информацию, полезную для планирования будущих экспериментов на рыбках. Например, территориальную агрессивность самцов или маскулинизацию самок у толстоголового гольяна под воздействием андрогенов. Характерное поведение данио выметывать икру с первыми лучами солнца может меняться под воздействием эстрогенов или антиандрогенов.

7.4.2.2 Наблюдения за качественными изменениями в поведении рыбок важны также и при отборе экспериментальных животных. Некоторые активные для эндокринной системы вещества могут немедленно повлиять на следующие особенности поведения тупоголового гольяна: окраска (осветление или потемнение), равномерность окраски (наличие вертикальных полос) и форма тела (в районе головы и груди). Поэтому наблюдения за физическим появлением рыбы должны проводиться в течение всего теста вплоть до его завершения.

7.4.3 Эвтаназия рыбы

На 21-й день, то есть при завершении экспозиции, рыбки должны быть подвергнуты эвтаназии с помощью раствора трикаина [трикаина метансульфонат, Metacain, MS 222 (CAS 886-86-2) в концентрации от 100 до 500 мг/л, буферизованный с 300 мг/л $NaHCO_3$ (CAS 144-55-8)], предназначенного для снижения раздражения слизистой оболочки; затем собирают кровь и ткань для определения вителлогенина.

7.4.4 Наблюдение за вторичными половыми признаками

Некоторые эндокринные нарушения могут влиять на вторичные половые признаки (количество брачных бугорков у самцов тупоголового гольяна, папиллярные бугорки у самцов медаки). Некоторые вещества могут также вызывать аномальные проявления вторичных половых признаков представителей другого пола; например, антагонисты рецепторов андрогена, такие как тренболон, метилтестостерон и дигидротестостерон, могут привести к развитию у самок тупоголового гольяна брачных бугорков или появлению папиллярных полос у самок медаки. Также было отмечено, что антагонисты рецепторов эстрогена могут привести к уменьшению числа брачных бугорков и размера затылочной подушки у взрослых самцов. Такие морфологические наблюдения могут предоставить полезную качественную и количественную информацию при планировании дальнейших исследований. Число и размер брачных бугорков у гольяна и папиллярные бугорки у медаки могут быть определены количественно непосредственно в ходе эксперимента или позднее в сохраненных образцах.

7.4.5 Вителлогенин (VTG)

7.4.5.1 Кровь собирают из хвостовой артерии/вены капиллярной трубочкой с гепарином с помощью микрогематокрита или шприцем с помощью пункции сердца. В зависимости от размера рыбки собираемые объемы крови колеблются от 5 до 60 мкл для гольяна и от 5 до 15 мкл для данио. Плазму отделяют от крови центрифугированием и хранят с ингибиторами протеазы при минус 80 °С до анализа на VTG. У медаки для анализа используется печень, у данио также может использоваться как источник ткани для анализа вителогенина гомогенат головы/хвоста. Измерение VTG должно проводиться по утвержденному гомологическому методу ELISA с использованием гомологических стандартов и антител VTG. Рекомендуется использовать метод, способный обнаружить VTG в плазме на уровне нескольких нг/мл плазмы (нг/мл ткани), который является фоновым уровнем для интактных самцов рыб.

7.4.5.2 Контроль качества анализа VTG достигается с помощью стандартных наборов химикатов и дублированием анализа. Для каждого метода ELISA строится матрица эффекта (эффект разбавления пробы) для определения минимального фактора разбавления. Каждая пластина ELISA, используемая для анализа VTG, должна включать следующие контрольные образцы: шесть стандартных калибровочных растворов, охватывающих ожидаемый диапазон концентраций вителлогенина, и один холостой опыт, проанализированный в двух повторностях. Степень поглощения света в холостых пробах должна составить меньше 5 % максимальной абсорбции стандартного калибровочного раствора. Должны быть проанализированы две пробы каждого типового разбавления. В случае разброса между повторностями более чем на 20 % анализ повторяют.

7.4.5.3 Коэффициент корреляции (R^2) для калибровочных кривых должен быть больше 0,99. Высокая степень корреляции недостаточна, для того чтобы гарантировать адекватное предсказание концентрации во всех диапазонах. В дополнение к наличию достаточно высокой корреляции значений калибровочной кривой к концентрации каждого стандарта вычисляют кривую стандартных растворов, которая должна находиться между 70 % и 120 % от ее номинальной концентрации. Если номинальная концентрация расположена далеко от линии регрессии калибровочного графика (например, при более низких концентрациях), это может привести к необходимости разбить калибровочную кривую в низком и высоком диапазонах или к использованию нелинейной модели, чтобы иметь возможность использовать полученные результаты абсорбции. Если кривая разбита, каждый ее сегмент должен иметь $R^2 > 0,99$.

7.4.5.4 Предел обнаружения (LOD) обозначается как концентрация наименьшего аналитического стандарта, предел количественного определения (LOQ) понимают как наименьшую концентрацию наименьшего стандарта, умноженную на самый низкий фактор разбавления.

7.4.5.5 В день выполнения анализа на вителлогенин проводят анализ усиленного образца стандартного раствора. Также систематически сверяют отношения между ожидаемой и измеренной концентрацией, выполненной в тот же день.

8 Результат и отчет

8.1 Оценка ответов биомаркеров с помощью дисперсионного анализа (ANOVA)

Чтобы идентифицировать потенциальное воздействие вещества на эндокринную систему, сравнивают результаты опытной и контрольной групп с помощью дисперсионного анализа (ANOVA). Если используется контроль, содержащий растворитель, соответствующий статистический тест должен быть выполнен между контролем с водой и контролем с растворителем для каждого наблюдаемого эффекта.

Все данные, связанные биологической реакцией, должны быть проанализированы и приведены в привязке к полу. Если гипотеза не проверятся с помощью параметрических методов — ненормальное распределение [например, тест Шапиро — Вилка (Shapiro-Wilk)] или гетерогенная дисперсия [тест Бартлета (Bartlett) или тест Левена (Levene)], должны быть рассмотрены возможность трансформировать данные для гомогенизации дисперсии до выполнения ANOVA или вариант для выполнения взвешенного анализа. Тест Даннетта (Dunnett) (параметрический) на многократные попарные сравнения или анализ Манна — Уитни (Mann-Whitney) (непараметрический) с регулированием Бонферрони (Bonferroni) может использоваться для немонотонного отношения «доза — ответ». Другие статистические тесты также могут использоваться (например, тест Jonckheere-Terpstra или тест Williams), если отношение «доза — ответ» является приблизительно монотонным.

8.2 Отчет об исследовании

Отчет об исследовании должен включать:

8.2.1 Установочные данные:

- степень подготовленности персонала к проведению теста;
- каждая лаборатория должна продемонстрировать свою компетентность, включая наличие необходимых реактивов.

8.2.2 Тестируемое вещество:

- характеристики тестируемого вещества;
- физическая природа и соответствующие физико-химические свойства;
- метод и частота подготовки тестовых концентраций;
- информация о стабильности и способности к разложению микроорганизмами.

8.2.3 Растворитель:

- исследование растворителя (природа, используемые концентрации);
- обоснование выбора растворителя (кроме воды).

8.2.4 Подопытные животные:

- виды и место разведения;
- поставщик и оборудование, применяемое при доставке;
- возраст рыбы в начале теста и репродуктивный статус;
- детали процедуры акклиматизации животных;
- вес тела рыбок в начале экспозиции (начиная с предварительного выбора рыбок).

8.2.5 Условия проведения теста:

- используемый метод (тип эксперимента, степень нагрузки, плотность заселения и т. д.);
- метод подготовки основных растворов и их расход;
- номинальные тестовые концентрации, еженедельное измерение концентраций экспериментальных растворов реактивов и используемые аналитические методы, средневзвешенные значения и среднеквадратичные отклонения в тестовых сосудах и данные, демонстрирующие, что измерения соотносятся с истинными концентрациями тестируемого вещества,
- особенности разбавляющей воды (включая pH, жесткость, щелочность, температуру, концентрацию растворенного кислорода, уровни остаточного хлора, общий органический углерод, сухой остаток и любые другие сделанные измерения);

- качество воды в тестовых аквариумах: pH, жесткость, температура и концентрация растворенного кислорода,

- подробная информация относительно кормления [например, тип корма(ов), источник, выданное количество корма и частота кормления, исследования о наличии загрязняющих примесей, если доступны (например, хлорорганические пестициды ПХБ)].

8.2.6 Результаты:

- доказательство, что контроль соответствует применяемым критериям теста;

- данные по смертности для каждой концентрации и контроля;

- использованные статистические методики, обработка данных и объяснение примененных методик;

- данные по биологическим макроскопическим наблюдениям, включая вторичные половые признаки, плодовитость и вителлогенин;

- результаты анализа данных — предпочтительно в табличной и графической формах;

- частота любых необычных реакций рыбок и любых видимых эффектов, вызванных тестируемым веществом.

8.3 Руководство по интерпретации и принятию результатов тестирования

8.3.1 В этом разделе анализируются параметры, которые необходимо учитывать для интерпретации результатов тестирования в отношении различных измеряемых эффектов. Результаты необходимо интерпретировать с осторожностью, когда кажется, что исследуемое вещество является причиной появления признаков токсичности или влияет на общее состояние экспериментальных животных.

8.3.2 В ходе предварительного теста по определению концентрации, для того чтобы можно было надежно интерпретировать данные, следует обратить внимание на то, чтобы не были превышены максимально переносимые концентрации. Важно применять по меньшей мере одну концентрацию, которая не вызывает каких-либо признаков токсичности. Симптомы заболевания и признаки токсичности анализируются и включаются в подробный отчет. Например, возможно, что на образование VTG у самок могут также повлиять общая токсичность и неэндокринные токсические воздействия, например гепатотоксичноть. Интерпретация полученных эффектов может быть дополнена другими уровнями загрязнений, которые не связаны с системной токсичностью.

8.3.3 Есть несколько аспектов, которые необходимо рассмотреть для принятия результатов тестов. Уровни VTG в контрольных группах самцов и самок должны отличаться примерно на три порядка у тупоголового гольяна и данио и на один порядок у медаки. Примерный диапазон значений, с которыми сталкиваются в контрольных группах, доступен в отчетах проверки точности. Высокие значения VTG у контрольных самцов могут поставить под угрозу точность анализа и его способность обнаружить слабых антагонистов эстрогена. Низкие значения VTG у самок контроля могут поставить под угрозу чувствительность анализа и его способность обнаружить ингибиторы ароматазы и антагонистов эстрогена. Исследования по проверке точности проводились для целей написания руководства.

8.3.4 Если лаборатория не выполняла ранее этот анализ или были допущены значимые изменения (например, вида рыб или поставщика), желательно, чтобы было проведено исследование технической компетенции. Рекомендуется использовать вещества, охватывающие диапазон воздействий или влияющие на некоторые измеряемые параметры во время теста. Каждой лаборатории рекомендуется разрабатывать свою собственную базу данных по контрольным самцам и самкам и делать тесты с положительным контролем для эстрогенной активности (например, 17β-эстрадиола на уровне 100 нг/л или других известных слабых агонистов), вызывающей увеличение VTG у самцов, положительного контроля для ингибирования ароматазы (например, фадрозол и прохлораз при 300 мг/л), вызывающей снижение VTG самок, и положительный контроль для андрогенной активности (17β-тренболона в дозе 5 мг/л) в результате индукции вторичных половых признаков у самок тупоголового гольяна и медаки. Все эти данные можно сравнить с имеющимися данными по проверке исследований для обеспечения компетентности лаборатории.

8.3.5 Измерения вителлогенина должны считаться положительными, если есть статистически значимое увеличение VTG у самцов ($p < 0,05$) или статистически значимое снижение у самок ($p < 0,05$), по крайней мере при самых высоких концентрациях по сравнению с контрольной группой при отсутствии признаков общей токсичности. Положительный результат далее подтверждается демонстрацией биологически вероятной зависимости между дозой и динамической характеристикой. Уменьшение вителлогенина может не всегда иметь эндокринное происхождение, однако положительный результат должен интерпретироваться как доказательство эндокринной деятельности *in vivo* и обычно является поводом для дальнейших исследований.

Приложение А
(справочное)

Условия эксперимента для определения воздействия на эндокринную систему рыб

Таблица А.1

1 Рекомендуемые виды	Тупоголовый гольян (*Pimephales promelas)*	Медака (Oryzias latipes)	Данио (Danio rerio)
2 Тип теста	проточный	проточный	проточный
3 Температура воды	25 °С ± 2°С	25 °С ± 2 °С	26 °С ± 2 °С
4 Освещение	Флуоресцентные лампы (широкого спектра)	Флуоресцентные лампы (широкого спектра)	Флуоресцентные лампы (широкого спектра)
5 Интенсивность освещения	10—20 μE/M2/s	10—20 μE/M2/s	10—20 μE/M2/s
6 Фотопериод	16 ч освещение, 8 часов темнота	12—16 ч освещение, 12—8 часов темнота	12—16 ч освещение, 12—8 часов темнота
7 Норма загрузки	< 5 г на л	< 5 г на л	< 5 г на л
8 Емкость аквариума	10 л минимум	2 л минимум	5 л минимум
9 Объем сосуда растворения	8 л минимум	1,5 л минимум	4 л минимум
10 Водобмен	шестикратный (минимум)	пятикратный (минимум)	пятикратный (минимум)
11 Возраст тестируемых организмов	См. 6.5.1	См. 6.5.1	См. 6.5.1
12 Примерный живой вес (г)	Самки: 1,5 ± 20 % Самцы: 2,5 ± 20 %	Самки: 0,35 ± 20 % Самцы: 0,35 ± 20 %	Самки: 0,65 ± 20 % Самцы: 0,65 ± 20 %
13 Количество особей в тестовом сосуде	6 (2 самца, 4 самки)	10 (5 самцов, 5 самок)	10 (5 самцов, 5 самок)
14 Количество репликаций	= 3 (плюс контроль)	= 3 (плюс контроль)	= 3 (плюс контроль)
15 Количество тестовых сосудов	4 минимум	4 минимум	4 минимум
16 Количество особей на концентрацию	16 взрослых самок и 8 самцов (4 самки и 2 самца в каждом повторе)	10 взрослых самок и 10 самцов (5 самок и 5 самцов в каждом повторе)	10 взрослых самок и 10 самцов (5 самок и 5 самцов в каждом повторе)
17 Режим кормления	Живая или замороженная артемия 2—3 раза в день (ad libitum), доступный коммерческий корм или их сочетание	Живая или замороженная артемия 2—3 раза в день (ad libitum), доступный коммерческий корм или их сочетание	Живая или замороженная артемия 2—3 раза в день (ad libitum), доступный коммерческий корм или их сочетание
18 Аэрация	Не допускать падения концентрации кислорода менее 60 % концентрации насыщения	Не допускать падения концентрации кислорода менее 60 % концентрации насыщения	Не допускать падения концентрации кислорода менее 60 % концентрации насыщения
19 Разбавляющая вода	Чистая поверхностная вода или восстановленная вода, или дехлорированная водопроводная	Чистая поверхностная вода или восстановленная вода, или дехлорированная водопроводная	Чистая поверхностная вода или восстановленная вода, или дехлорированная водопроводная
20 Период преэкспозиции	7 дней	7 дней	7 дней

Окончание таблицы А.1

21 Биологические маркеры	- выживаемость - поведение - вторичные половые признаки - VTG	- выживаемость - поведение - вторичные половые признаки - VTG	- выживаемость - поведение - VTG
22 Критерии достоверности теста	Растворенный кислород ≥ 60 % от насыщения при температуре (25 ± 2) °С; 90 % выживаемость рыб в контроле; изменение концентрации тестируемого вещества в начале и конце эксперимента не более 20 %	Растворенный кислород ≥ 60 % от насыщения при температуре (24 ± 2) °С; 90 % выживаемость рыб в контроле; изменение концентрации тестируемого вещества в начале и конце эксперимента не более 20 %	Растворенный кислород ≥ 60 % от насыщения при температуре (26 ± 2) °С; 90 % выживаемость рыб в контроле; изменение концентрации тестируемого вещества в начале и конце эксперимента не более 20 %

Приложение В
(рекомендуемое)

Некоторые параметры разбавляющей воды

Таблица В.1

Вещество	Концентрация
Взвешенные вещества	< 20 мг/л
Общий органический углерод	< 2 мг/л
Ион аммония	< 1 мкг/л
Остаточный хлор	< 10 мкг/л
Общие фосфорорганические пестициды	< 50 нг/л
Общие хлорорганические пестициды плюс полихлорированные бифенилы	< 50 нг/л
Общий органический хлор	< 25 нг/л

Приложение С
(рекомендуемое)

Нерестовый субстрат для данио рерио

Нерестовая пластина: пластина из инструментально стекла, например 22 × 15 × 5,5 см (д × ш × в), покрытая сеткой из нержавеющей стали (размер ячейки 2 мм). Основа решетки должна находиться ниже края пластины.

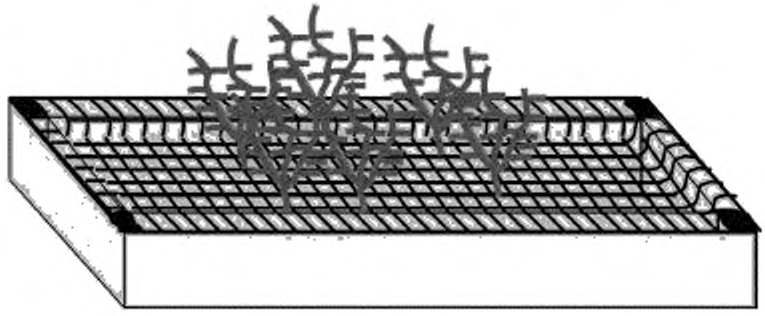


Рисунок С.1

Нерестовый субстрат должен быть установлен на решетке. Он должен давать возможность рыбкам перемещаться. Например, это могут быть искусственные аквариумные растения, сделанные из зеленого пластика, которые подходят лучше всего (NB: нужно изучить возможную адсорбцию тестируемого вещества к пластику). Искусственные растения должны быть вымыты в теплой воде в течение времени, достаточного для того, чтобы гарантировать невозможность внесения в аквариум других загрязняющих веществ. Использование стеклянных материалов должно гарантировать невозможность получения ран рыбами и не должно стеснять их энергичные движения.

Расстояние между пластиной и стенками аквариума не должно превышать 3 см, чтобы избежать нереста вне пластины. Икра, вымеченная на пластину, проваливается сквозь решетку и должна быть отобрана в течение от 45 до 60 минут после начала освещения. Прозрачные икринки не прилипают и могут быть легко подсчитаны с использованием трансверсального света. Для пяти самок в аквариуме число отложенных икринок можно считать низким, если количество икры менее или равно 20 в день, среднее количество до 100 и больше 100 икринок в день оценивают как высокую плодовитость. Нерестовую пластину удаляют, собранные икринки и нерестовую пластину перемещают в тестовую емкость по возможности вечером или ранним утром. Повторная установка пластины должна быть осуществлена в течение часа, в противном случае нерестовый субстрат вызовет индивидуальное спаривание и нерест в необычное время. Если необходима более поздняя установка нерестовой пластины, это должно быть сделано не менее чем через 9 часов после начала освещения. Так поздно нерест не осуществляется.

Приложение D
(рекомендуемое)

Нерестовый субстрат для тупоголового гольяна

Две или три нерестовых пластины из пластмассы/керамики/стекла или из нержавеющей стали помещают в каждый тестовый аквариум (например, кусок полукруглого 80 мм водосточного желоба длинной 130 мм) (см. рисунок D.1). Существует доказательство того, что в качестве нерестового субстрата может быть использована платина из ПВХ или керамики (Thorpe *и др.*, 2007).

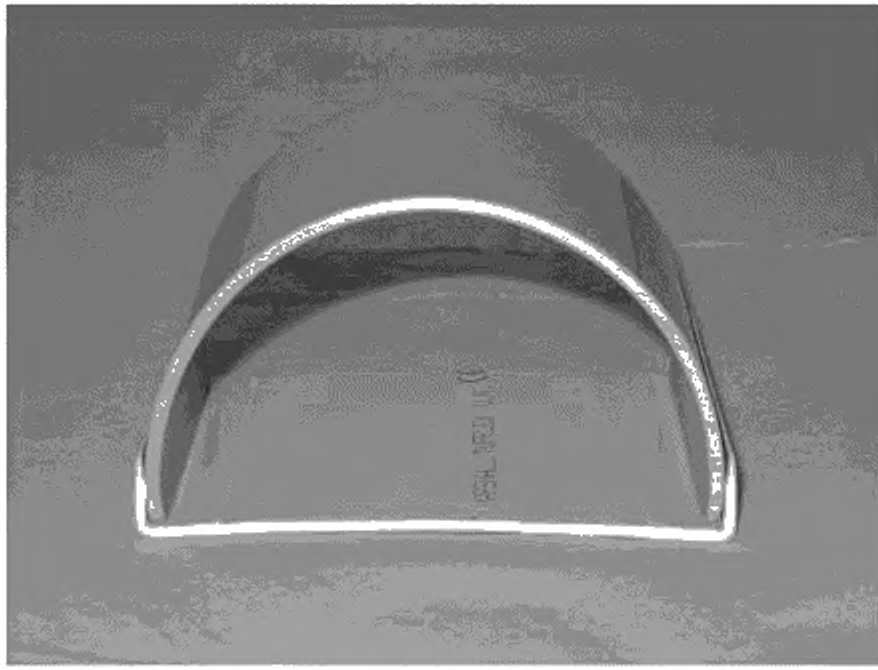


Рисунок D.1

Основа конструкции предназначена для сбора икры, которая не приклеивается к поверхности пластины и падает на дно, где икринки непосредственно располагаются. Весь субстрат вымачивают в течение не менее 12 часов перед использованием.

Приложение Е
(справочное)

Оценка вторичных половых признаков у тупоголового гольяна для обнаружения некоторых веществ, активных по отношению к эндокринной системе

Е.1 Краткий обзор

Потенциально важными признаками физического состояния у взрослых особей тупоголового гольяна при проведении исследований эндокринных нарушений являются: цвет (светлый/темный), рисунок окраски (присутствие или отсутствие вертикальных полос), форма тела (головной и грудной отделы, увеличение брюшка) и специальные вторичные половые признаки (число и размер брачных бугорков, размер спинной подушки и яйцеклада).

Брачные бугорки расположены на голове (спинная подушка) половозрелых самцов тупоголового гольяна и обычно расположены билатерально и симметрично (Jensen и др., 2001). Самки и ювенильные особи обоих полов бугорков не имеют (Jensen и др., 2001). Самцы могут иметь до восьми бугорков вокруг глаз и возле ноздрей (Jensen и др., 2001). Самое большое количество и самые большие по размеру бугорки расположены в две параллельные линии ниже ноздрей и выше рта. У многих рыб есть группы бугорков под нижней челюстью; возле рта в основном находятся единичные пары, в то время как брюшко может насчитывать до четырех бугорков. Фактическое число бугорков редко превышает 30 (обычно от 18 до 28; Jensen и др., 2001). Бугорки в основном имеют одинаковую форму, обычно округлые, с высотой, приблизительно равной радиусу. Большинство репродуктивно активных самцов могут иметь сильно увеличенные бугорки, состоящие из нескольких, слившихся в один.

Некоторые типы воздействующих на эндокринную систему химикатов могут вызвать аномальное расположение вторичных половых особенностей к противоположному полу; например, антагонисты рецептора андрогена, такие как 17β-метилтестостерон или 17β-тренболон, могут вызвать развитие брачных бугорков у женских особей гольяна (Smith 1974; Ankley *и др.*, 2001; 2003), в то время как антагонисты рецептора эстрогена могут привести к уменьшению числа или размера брачных бугорков у самцов (Miles-Richardson и др., 1999; Harries и др., 2000).

Ниже дано описание исследования брачных бугорков у тупоголового гольяна, основанных на процедурах, используемых в американской лаборатории Управления по охране окружающей среды (USEPA) в Дулуте, Миннесота. Некоторые продукты и/или оборудование могут быть заменены на сопоставимые доступные материалы.

Исследования лучше всего проводить, используя лупу с подсветкой или бинокулярный микроскоп с подсветкой (3Х). Рыба находится в дорсальном положении головой к исследователю.

a) Расположите рыбу в малой чашке Петри (например, 100 мм в диаметре) на боку хвостом вперед. Настройте видоискатель для идентификации бугорков. Осторожно и медленно переверните рыбу с одного бока на другой, чтобы идентифицировать области бугорков. Посчитайте и классифицируйте бугорки.

b) Повторите исследование на вентральной задней поверхности тела рыбы, повернув рыбу на спину хвостом вперед в чашке Петри.

c) Наблюдения должны быть проведены в течение 2 минут для каждой рыбы.

Е.2. Подсчет и классификация бугорков

Шесть определенных областей должны быть идентифицированы для оценки наличия бугорков и их развития у взрослых особей тупоголового гольяна. Разработана таблица А.1 для картирования расположения и количества бугорков (см. приложение А). Число бугорков регистрируется, и их размер количественно оценивается как: 0 — отсутствие, 1 — наличие, 2 — увеличенный, 3 — явно выраженный для каждого организма (рисунок Е.1).

Класс 0 — отсутствие всех бугорков. Класс 1 — бугорки присутствуют, идентифицируются как бугорки, у которых одна вершина, а высота примерно равна ширине (диаметру). Класс 2 — увеличенные бугорки, ткань которых внешне напоминает звездочку, обычно большего диаметра и имеют канавки или борозды, появляющиеся из центра. Высота бугорков часто более иррегулярна, может быть несколько скруглена. Класс 3 — бугорки выраженные, обычно весьма крупные и округлые с менее выраженной структурой. Эти бугорки иногда сливаются вместе и образуют единую массу на протяжении одной или нескольких областей (B, C и D, см. Е.3). Цвет и форма подобны классу 2, но часто менее выражены. Использование этой системы оценки дает общее количество бугорков < 50. У нормального самца в контроле количество бугорков от 18 до 20 (Jensen и др., 2001).

Некоторые рыбы могут иметь большее количество бугорков, так как матрица (см. приложение А) не включает некоторые зоны. Если это произошло, следует сделать дополнительную оценку направо и налево от области подсчета. Матрица не обязательно должна быть симметричной. Другая методика для картирования бугорков, которые соединены попарно или вертикально вдоль линии рта, может привести к двойному учету бугорков, то есть подсчету двух слившихся бугорков как одного.

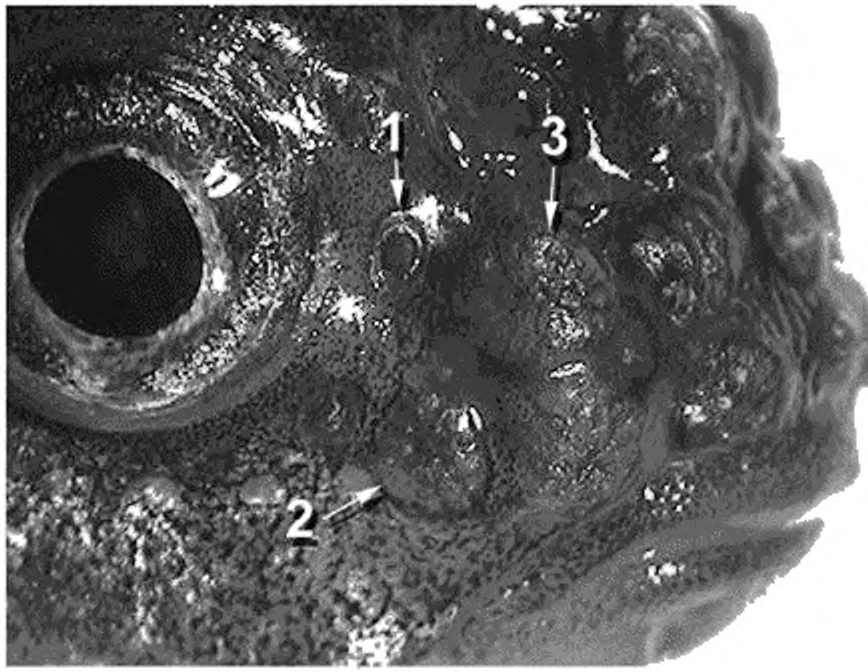


Рисунок Е.1

Е.3. Зоны картирования:

А — Бугорки, расположенные вокруг глаз. Расположены с дорсальной по вентральную часть вокруг внешней границы глаз. Обычно они многочисленны у взрослых самцов контроля и отсутствуют у самок контроля, как правило, парны (одна возле каждого глаза) или имеются в единичных количествах у самок, подвергнутых действию андрогенов.

В — Бугорки расположены непосредственно между ноздрей (сенсорный канал). В норме парные у самцов контроля, сильно развиты (два увеличенных или три явных). Отсутствуют у самок контроля, но иногда встречаются у самок, подвергнутых действию андрогенов.

С — Бугорки, расположенные непосредственно перед ноздрями, параллельно рту. Обычно увеличены или выражены у взрослых самцов контроля. Присутствуют или увеличены у менее развитых самцов или у самок, подвергнутых действию андрогенов.

D — Бугорки, расположенные параллельно линии рта. Обычно оцениваются как «развитые» у самцов контроля. Отсутствуют у самок контроля, но имеются у подвергнутых действию андрогена самок.

Е — Бугорки, расположенные на нижней челюсти, как правило, маленькие и парные. Изменчивы у самцов контроля или эксперимента и экспонированных самок.

F — Бугорки, расположенные под зоной Е. Обычно маленькие и парные. Присутствуют у самцов контроля и подвергнутых действию андрогена самок.

Приложение F
(справочное)

Матрица картографирования бугорков. Цифровая классификация

Идентификационный № _____

Дата _____

Общий счет _____

1 — наличие

2 — увеличенные

3 — выраженные

	A	XI	XI	XI	XI

	B	XI	XI	XI	XI

	C	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI
	D	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI	XI

	E	XI	XI		
	F	XI	XI	XI	XI

Приложение G
(Справочное)

Оценка вторичных половых признаков у медаки для обнаружения определенных веществ, воздействующих на эндокринную систему

Папиллярные бугорки являются вторичными половыми признаками медаки (*Oryzias latipes*).

Папиллярные бугорки обычно появляются только у взрослых самцов и расположены между вторым и седьмым или восьмым лучами анального плавника (рисунок G.1 и G.2). Очень редко они могут появляться на первом луче плавника. Стандартная процедура (СП) позволяет измерять бугорки на первом луче плавника (число лучей считается в этой СП от хвоста).

G.1 После иссечения печени (приложение Е) тушку помещают в коническую тубу, содержащую приблизительно 10 мл 10%-ного нейтрального буферизованного водного раствора формальдегида (верх головы, низ хвоста). Если гонада фиксирована в другом растворе кроме 10%-ного нейтрального буферизованного водного раствора формальдегида, сделайте с помощью бритвы поперечный разрез через тушку между областью анального ребра и задним проходом, стараясь не задеть гонопоры и гонады (рисунок G.3). Разместите головную часть тела рыбы в фиксирующем растворе для сохранения гонады и хвостовую часть тела рыбы в 10%-ном нейтральном буферизованном водном растворе формальдегида, как описано выше.

G.2 После размещения тела рыбы в 10%-ном нейтральном буферизованном водном растворе формальдегида ухватите область позади анального плавника пинцетом и согните ее приблизительно на 30 секунд, чтобы открыть анальный плавник. Взяв анальный плавник пинцетом, осторожно ухватите несколько лучей плавника, чтобы не повредить папиллярные бугорки.

G.3 Подержав анальный плавник открытым приблизительно 30 секунд, сохраните тело рыбы в 10%-ном буферизованном растворе формальдегида при комнатной температуре до измерения папиллярных бугорков (измерение должно быть проведено по истечении 24 часов).

Измерение:

1) После фиксации тела рыбы в 10%-ном растворе формальдегида в течение 24 часов выньте тушку рыбы из конической тубы и удалите формальдегид на фильтровальной бумаге (или бумажном полотенце).

2) Поместите рыбу на брюшко. Затем аккуратно удалите анальный плавник, используя малые ножницы рассечения (предпочтительно удаляйте анальный плавник с небольшим количеством эндоскелета).

3) Ухватите заднюю часть отделенного анального плавника пинцетом и поместите его на стеклянную пластину с несколькими каплями воды. Затем покройте анальное ребро покровным стеклом, стараясь не рассечь папиллярные бугорки во время захватывания анального плавника пинцетом.

4) Подсчитайте количество слившихся папиллярных бугорков, используя счетчик для биологического микроскопа (микроскоп прямого света или инвертированный микроскоп). Папиллярные бугорки учитываются, когда формации бугорков заметны на задней части пластинки. Зарегистрируйте в рабочем журнале количество слившихся папиллярных бугорков в каждом луче плавника (например, первый луч — 0, второй луч — 10, третий луч — 12 и т. д.) и затем рассчитайте сумму с помощью таблицы Excel для каждой индивидуальной рыбки. В случае необходимости сделайте фотографию анального плавника и подсчитайте число слившихся папиллярных бугорков на фотографии.

5) После измерения поместите анальный плавник в коническую тубу, описанную в (1), для хранения.

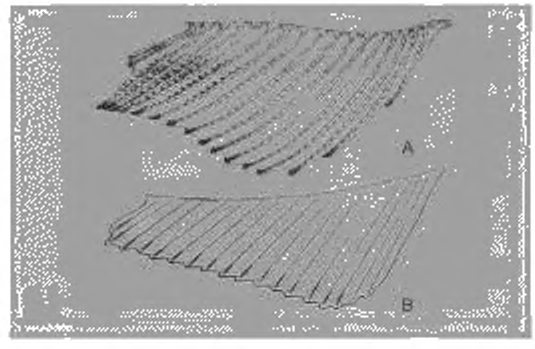


Рисунок G.1 — Схема, иллюстрирующая различие в форме и размере анального плавника в зависимости от пола

A — самец; B — самка (Ока Т. В., 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).

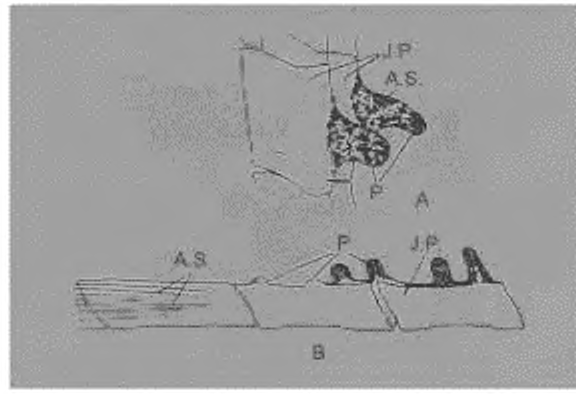


Рисунок G.2 — Папиллярные бугорки, расположенные на сросшихся пластинах лучей анального плавника

JP — сросшаяся пластина; AS — осевое пространство; P — бугорок; B — дистальный конец анального плавника. Актинотрихии (Act) находятся на конце (Ока Т. В., 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).

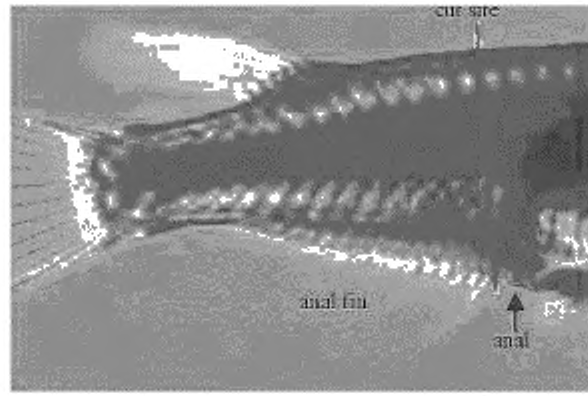


Рисунок G.3

Фотография, показывающая место разреза, когда гонада фиксируется в другом растворе кроме 10%-ного нейтрального буферизованного водного раствора формальдегида. В этом случае тело разрезается между областью, предшествующей анальному плавнику и анусу, с помощью бритвы (красная стрелка). Голова рыбы помещается в тот же фиксирующий раствор, который используется для сохранения гонад, а хвост рыбы — в 10%-ный нейтральный буферизованный водный раствор формальдегида.

Приложение Н
(справочное)

Рекомендуемые процедуры для типового определения содержания вителлогенина

Следует соблюдать осторожность, чтобы избежать перекрестного загрязнения между образцами VTG самцов и самок.

Процедура 1А: Тупоголовый гольян, забор крови из хвостовой вены/артерии

После анестезии хвостовую часть надрезают скальпелем и собирают кровь из хвостовой вены/артерии с помощью капиллярной пипетки гепариновым микрогематокритом. После того как кровь собрана, быстро отделяют плазму центрифугированием в течение 3 минут при 15 000 g (или альтернативно 10 минут при 15,000 g при 4 °С). Процент гематокрита в конечном итоге может быть определен после центрифугирования. Затем плазму удаляют пипеткой с микрогематокритом и хранят в пробирке центрифуги с 0,13 единицами апротинина (ингибитор протеазы) при минус 80 °С до анализа вителлогенина. В зависимости от размера тупоголового гольяна (который зависит от пола) собранные объемы плазмы колеблются от 5 до 60 микролитров на рыбу (Jensen *и др.*, 2001).

Процедура 1В: тупоголовый гольян, сбор крови пункцией сердца

Альтернативно кровь может быть также собрана проколом сердца с помощью гепаринизированного шприца (1000 единиц гепарина на мл). Кровь переносят в пробирки Эппендорфа (выдержанные на льду) и затем центрифугируют (5 минут, 7000 g при комнатной температуре). Плазму перелить в чистые пробирки Эппендорфа (аликвотно, если объем плазмы это позволяет) и быстро заморозить при минус 80 °С до проведения анализа (Panter и др., 1998).

Процедура 2А: японская медака, удаление печени

Удаление тестируемой рыбы из испытательной камеры:

(1) Тестируемая рыба должна быть удалена из испытательной камеры с использованием сачка с мелкой сеткой. С осторожностью выпускайте тестируемую рыбу в другие испытательные камеры.

(2) Тестируемые рыбки должны быть удалены в следующем заказе: контроль растворителя (если необходимо), самая низкая концентрация, средняя концентрация, самая высокая концентрация и положительный контроль. Кроме того, все самцы должны быть удалены из испытательной камеры раньше самок.

(3) Пол каждой тестируемой рыбы идентифицируют по внешним вторичным половым признакам (например, форме анального плавника).

(4) Поместите тестируемую рыбу в контейнер для транспортировки и перенесите ее на рабочее место для удаления печени. Проверьте этикетки тестовых аквариумов и транспортного контейнера для точности и убедитесь, что количество рыб, которые были удалены из тестового аквариума, и количество выловленных рыб, совпадают.

(5) Если пол не может быть идентифицирован по внешнему виду рыбы, удалите всю рыбу из тестового аквариума. В этом случае пол должен быть идентифицирован по анализу гонад или вторичным половым признакам под бинокулярным микроскопом.

Удаление печени:

(1) Перенесите тестируемую рыбу из транспортного контейнера в анестезирующий раствор, используя сачок с мелкой сеткой.

(2) После того как тестируемая рыба обезболена, переложите ее на фильтровальную бумагу (или бумажное полотенце) с помощью пинцета (обычного тип), захватывая тестируемую рыбу пинцетом за боковые поверхности головы, чтобы предотвратить ломку хвоста.

(3) Вытрите воду с поверхности тела тестируемой рыбы фильтровальной бумагой (или бумажным полотенцем).

(4) Положите рыбу на спинку. Сделайте малый поперечный разрез брюшка от проекции затылка до середины брюшной области с помощью препарационных ножниц.

(5) Вставьте препарационные ножницы в разрез и расширьте его от задней части жабр до ануса вдоль средней линии живота. Старайтесь не вставлять ножницы слишком глубоко, чтобы не повредить печень и гонады.

(6) Проведите следующие операции под бинокулярным микроскопом.

(7) Разместите рыбу на спине на бумажном полотенце (или стеклянной чашке Петри, или на предметном стекле).

(8) Раздвиньте стенки брюшной полости тонким пинцетом и выньте внутренние органы. Также возможно для экстериоризирования внутренних органов удалить одну сторону стенки брюшной полости в случае необходимости.

(9) Разложите соединенную часть печени и желчного пузыря, используя другую пару тонких пинцетов. Захватите желчный проток и отделите желчный пузырь. Старайтесь не порвать желчный пузырь.

(10) Захватите пищевод и таким же образом удалите желудочно-кишечный тракт от печени. Старайтесь не пролить содержимое желудочно-кишечного тракта. Вырежьте прямой кишечник и анус и удалите желудочно-кишечный тракт из брюшной полости.

(11) Удалите жировые и другие ткани, находящиеся вокруг печени. Старайтесь не повредить печень.

(12) Захватите печеночную вену с помощью пинцета и удалите печень из брюшной полости.

(13) Поместите печень на покровное стекло. С помощью тонкого пинцета удалите, если это необходимо, оставшиеся жировые и иные посторонние ткани (например, частицы брюшной стенки) с поверхности печени.

(14) Взвесьте печень вместе с микропробиркой на 1,5 мл, используя электронные аналитические весы. Запишите результат в рабочем дневнике (с точностью до 0,1 мг). Проверьте идентификационную надпись на микропробирке.

(15) Закройте крышку микропробирки с печенью. Храните ее в морозильнике (или емкости со льдом).

(16) После удаления одной печени очистите препарационное оборудование или замените его на чистое.

(17) Удалите печень изо всех рыб и разместите ее в соответствующих емкостях, как описано выше.

(18) После того как печень удалена у всех рыб (то есть всех самцов или самок в тестовом аквариуме), поместите все экспериментальные образцы печени в стойку трубы с идентификационными ярлыками и сохраните в морозильнике. Если печень предполагается использовать для предварительной обработки сразу после удаления, образцы переносят на рабочее место в охлаждающейся стойке (или емкости со льдом).

Оставшийся после удаления печени скелет рыб используют для измерения вторичных половых признаков.

Образец

Образцы печени, взятые у тестируемых рыб, если они не используются для предварительной обработки вскоре после удаления, хранятся при температуре ≤ – 70 °С

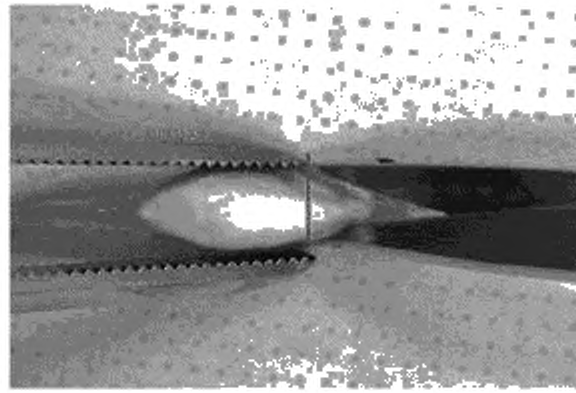


Рисунок Н.1 — Разрез передней части грудных плавников осуществляется с помощью ножниц

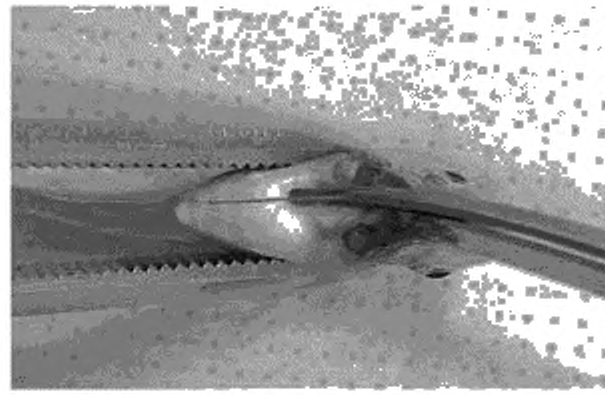


Рисунок Н.2 — Делается разрез ножницами по средней линии брюшка от точки, расположенной приблизительно в 2 мм от черепной коробки к анусу

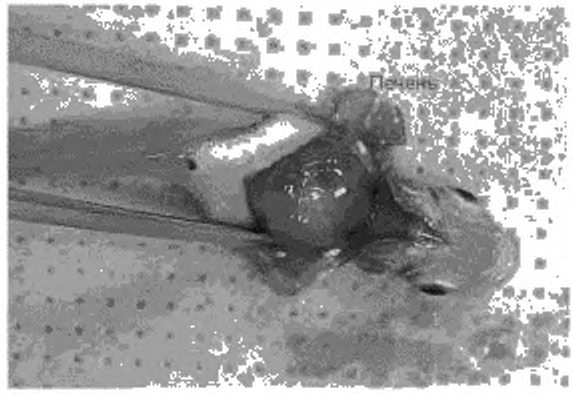


Рисунок Н.3 — Стенки брюшка раскрывают пинцетом для извлечения печени и других внутренних органов (альтернативно брюшные стенки могут быть удалены)

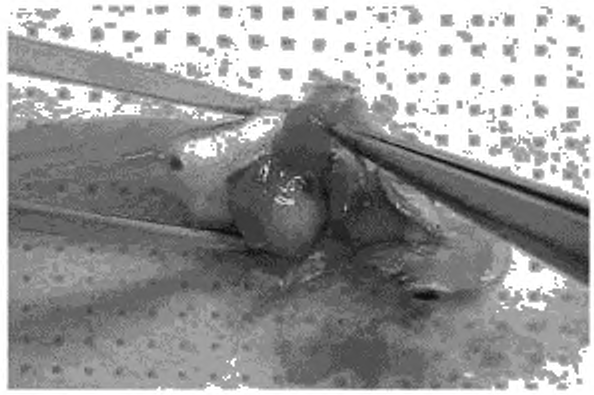


Рисунок Н.4 — Печень препарируется и удаляется пинцетом

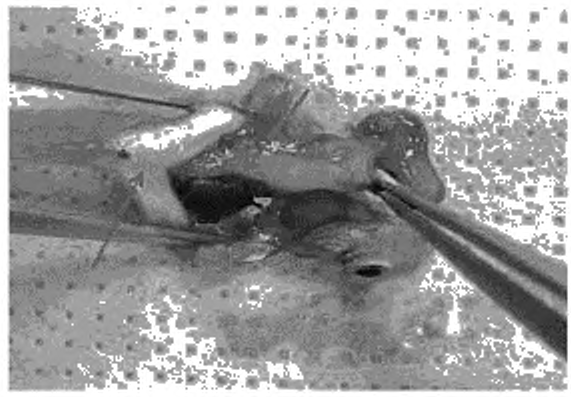


Рисунок Н.5 — Осторожно отделяют кишечник, используя пинцет

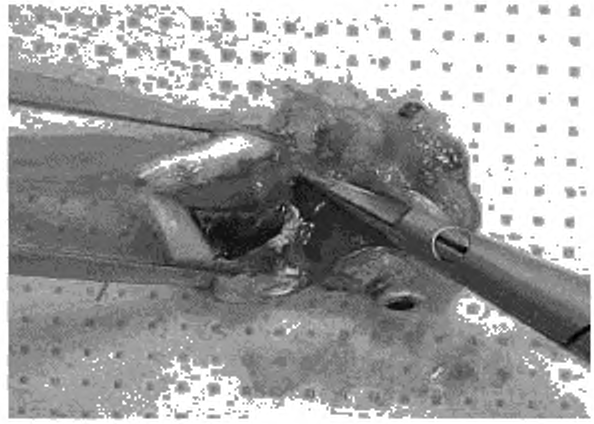


Рисунок Н.6 — Оба конца кишечника и прилегающая брыжейка отделяются ножницами

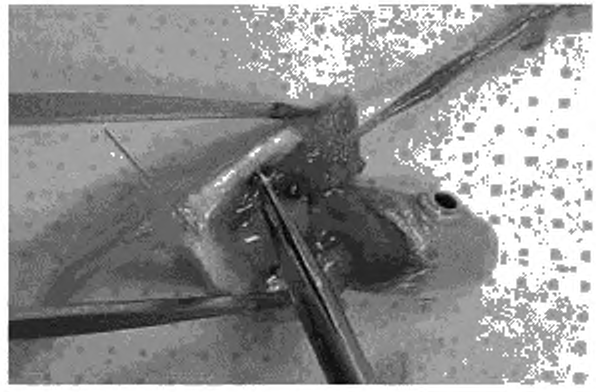


Рисунок Н.7 — Процедура идентична для самок



Рисунок Н.8 — Заключительная процедура

Процедура 2 В: Медака японская (*Oryzias latipes*). Предварительная подготовка печени для анализа вителлогенина

Возьмите флакон, содержащий гомогенатный буфер из набора ELISA, и охладите его с измельченным льдом (температура раствора: ≤ 4 °С). Если используется гомогенатный буфер из набора EnBio ELISA, оставьте оттаять раствор при комнатной температуре, затем охладите флакон с измельченным льдом.

Рассчитайте объем гомогенатного буфера для печени, исходя из ее веса (используйте 50 мкл буфера на мг веса печени для гомогенирования). Например, если вес печени 4,5 мг, объем буфера составит 225 мкл. Подготовьте список необходимых объемов буфера для всех образцов печени.

Подготовка печени для предварительной обработки:

(1) Возьмите микропробирку на 1,5 мл, содержащую печень из морозильника перед предварительной обработкой.

(2) Предварительная обработка печени самцов должна быть выполнена раньше самок, чтобы предотвратить загрязнение вителлогенином. Кроме того, предварительная обработка для тестируемых групп должна быть проведена в следующей последовательности: контроль, контроль растворителя (если применимо), самая низкая концентрация, средняя концентрация, самая высокая концентрация и положительный контроль.

(3) Число микропробирок на 1,5 мл, содержащих образцы печени, взятых из морозильника, не должно превысить число, которое можно центрифугировать.

(4) Установите микропробирки на 1,5 мл, содержащие образцы печени, в емкости со льдом в последовательности проведения анализа (размораживание печени не важно).

Проведение предварительной обработки

1 Добавьте гомогенатный буферный раствор.

Проверьте список объемов гомогенатного буфера, которые будут использоваться для каждого образца печени, и выставьте микропипетку (диапазон объемов: от 100 до 1000 мкл) на соответствующий объем. Присоедините чистый наконечник к микропипетке.

Возьмите гомогенатный буфер из флакона и добавьте буфер в микропробирку на 1,5 мл, содержащую печень.

Добавьте гомогенатный буфер ко всем микропробиркам на 1,5 мл, содержащим печень, согласно процедуре, описанной выше. Нет никакой потребности менять наконечник микропипетки на новый. Однако если ее конец загрязнен или наконечник, необходимо заменить.

2 Гомогенизация печени

(1) Присоедините новый пилон для гомогенизации к гомогенизатору микропробирки.

(2) Вставьте пилон в микропробирку на 1,5 мл. Установите гомогенизатор для раздавливания печени между поверхностью пилона и внутренней стенкой микропробирки на 1,5 мл.

(3) Включите гомогенизатор на 10—20 секунд. Охлаждайте микропробирку измельченным льдом во время операции.

(4) Выньте пилон из микропробирки и оставьте ее в покое приблизительно на 10 секунд. Затем осуществите визуальную проверку состояния суспензии.

(5) Если в суспензии наблюдаются частички печени, повторите операции (3) и (4), чтобы подготовить однородный гомогенат печени.

(6) Охладите суспендированный гомогенат печени на льду перед центрифугированием.

(7) Замените пилон на новый для каждого гомогенирования.

(8) Гомогенизируйте всю печень с гомогенатным буфером согласно процедуре, описанной выше.

3 Центрифугирование суспендированного гомогената печени

(1) Установите температуру охлаждающей камеры центрифуги на ≤ 5 °С.

(2) Вставьте микропробирку на 1,5 мл, содержащую суспендированный гомогенат печени, в охлаждающую центрифугу (отрегулируйте баланс в случае необходимости).

(3) Центрифугируйте суспендированный гомогенат печени при 13 000 g в течение 10 минут при ≤ 5 °С. Однако если супернатант корректно отделился, центробежная сила и время центрифугирования могут быть соответственно скорректированы.

(4) После центрифугирования проверьте, что супернатант качественно отделился (на поверхности — липиды, промежуточные — супернатант, осадок — ткани печени). Если разделение некачественно, центрифугируйте суспензию снова при тех же самых условиях.

(5) Удалите все образцы для испытания из охлаждающей центрифуги и установите их в емкости со льдом в порядке проведения испытания. Старайтесь не взболтать пробирки.

4 Сбор супернатанта

(1) Поместите четыре микропробирки на 0,5 мл в штатив для хранения супернатанта.

(2) Возьмите 30 мкл каждого супернатанта (сформированного как промежуточный слой) микропипеткой и соберите его в одной микропробирке на 0,5 мл. Старайтесь не собирать липиды с поверхности или ткани печени в осадке.

(3) Соберите супернатант и распределите его на две другие микропробирки на 0,5 мл тем же способом, как описано выше.

(4) Соберите остальную часть супернатанта микропипеткой (если возможно: ≥ 100 µL). Распределите супернатант на оставшиеся микропробирки на 0,5 мл. Старайтесь не собирать липиды с поверхности или ткани печени в осадке.

(5) Закройте колпак микропробирки на 0,5 мл и запишите объем супернатанта на ярлыке. Затем немедленно охладите микропробирки на льду.

(6) Заменяйте наконечник микропипетки на новый для каждого образца супернатанта. Если к наконечнику прилипает большое количество липидов, немедленно замените наконечник, чтобы избежать загрязнения экстракта печени жиром.

(7) Распределите весь центрифугируемый супернатант на четыре микропробирки по 0,5 мл согласно процедуре, описанной выше.

(8) После распределения супернатанта на микропробирки по 0,5 мл поместите их в штатив с идентифицирующими этикетками и затем немедленно заморозьте их в морозильнике. Если концентрации VTG измеряются непосредственно после предварительной обработки, держите одну микропробирку на 0,5 мл (содержащую 30 мкл супернатанта) в охлаждающем штативе и передайте ее на рабочее место проведения анализа ELISA. В этом случае поместите оставшиеся микропробирки в штатив и заморозьте их в морозильнике.

(9) После сбора супернатанта утилизируйте остаток в соответствии с принятой процедурой.

Хранение испытательных образцов

Храните микропробирки на 0,5 мл, содержащие супернатант гомогената печени при ≤ – 70 °С до проведения анализа ELISA.

Процедура 3А: Данио рерио, сбор крови из хвостовой артерии/вены

Незамедлительно после анестезии делается рассечение возле хвоста и кровь из хвостовой артерии/вены собирается в микрогематокритные капиллярные трубки с гепарином. Объемы крови колеблются от 5 до 15 микролитров в зависимости от размера рыбы. Равный объем буфера апротинина [6 мкг/мл в фосфатном буферном растворе (ФБР)] добавляется в микрокапиллярные трубки, и отделяют плазму от крови центрифугированием (5 минут при 600 g). Плазму собирают в пробирки и хранят при минус 20 °С до проведения анализа на вителлогенин или другие белки.

Процедура 3В: Данио рерио, сбор крови пункцией сердца

Чтобы избежать коагуляции крови и разложения белка, образцы собирают в фосфатный буферный раствор, содержащий гепарин (1000 ед/мл) и ингибитор протеазы апротинин (2 TIU/мл). Для приготовления буфера рекомендуются гепарин, соль аммония и лиофилизированный апротинин. Для забора крови рекомендуется шприц (1 мл) с неподвижной тонкой иглой (например, Braun Omnikan-F). Шприц должен быть предварительно наполнен буфером (приблизительно 100 мкл), чтобы полностью элюировать малые объемы крови от каждой рыбки. Образцы крови берутся проколом сердца. Рыба вначале должна быть анестезирована MS 222 (трикаин метанесульфонат) (100 мг/л). Правильно примененная анестезия позволяет различить сердцебиение данио. Прокалывая сердце, держите поршень шприца под небольшим давлением. Собираемые объемы крови составляют от 20 до 40 мкл. После пункции сердца кровь/буферная смесь должна быть перенесены в пробирку. Плазма отделяется от крови центрифугированием (20 минут; 5000 g) и должна храниться при минус 80 °С до проведения анализа.

Процедура 3С: Стандартная операционная процедура: данио рерио, гомогенизация головы и хвоста



Рисунок Н.9

1 Рыбы подвергнуты анестезии и эвтаназии в соответствии с описанием в тесте.

2 Голова и хвост рыбы отрезаются в соответствии с рисунком Н.9. Важно: *все инструменты для вскрытия, так же как и препарационный стол, должны быть вымыты и очищены должным образом (например, с 96%-ным*

этиловым спиртом) между обработкой каждой конкретной рыбы, чтобы предотвратить загрязнение вителлогенином (ВТГ) от самок или чтобы индуцированные самцы не загрязнили интактных самцов.

3 Общий вес головы и хвоста каждой рыбы взвешивается с точностью до мг.

4 После взвешивания части помещают в соответствующие пробирки (например, Эппендорфа на 1,5 мл) и замораживают при минус 80 °С до момента гомогенизации или сразу гомогенизируют на льду с двумя пластиковыми пестиками. (Могут использоваться другие методы, если они проводятся на льду и дают результат — однородную массу.) Важно: *пробирки должны быть пронумерованы так, чтобы голова и хвост от рыбы могли быть связаны с соответствующей частью тела, используемой для гистологии гонад.*

5 Для получения однородной массы добавляют ледяной гомогенизационный буфер[1)] в количестве четырех от измеренного веса ткани. Продолжайте работать с пестиками, пока смесь не станет гомогенной. Важное замечание: *используются новые пестики для каждой рыбы.*

6 Образцы помещены в лед до центрифугирования при 4 °С при 50 000 g в течении 30 минут.

7 Используйте пипетку для забора 20 мкл супернатанта по крайней мере в двух пробирках, опуская конец пипетки ниже плотного слоя на поверхности и тщательно собирая супернатант без жира или частиц ткани.

8 Пробирки хранят при минус 80 °С до использования.

[1)] **Гомогенизационный буфер:**

[50 ммоль трис-HCl с pH 7,4; 1% смеси ингибиторов протеаз (Сигма)]: 12 мл трис-HCl с pH 7,4 +120 мкл смеси ингибиторов протеаз.

- ТРИС: ТРИС-УЛЬТРА ЧИСТЫЙ (ICN), например производства Bie & Berntsen (Danemark);
- смесь ингибиторов протеаз: производства Sigma (из тканей животных). Номер продукта P 8340.

ВАЖНО. Гомогенизационный раствор используется в день приготовления. Держите раствор на льду во время использования.

Приложение I
(справочное)

Усиленные образцы вителлогенина, используемые как эталоны при проведении межлабораторного теста

В день выполнения анализов на вителлогенин необходимо сделать усиление пробы с помощью эталонного референтного образца. Вителлогенин, используемый для приготовления эталона, сильно отличается от используемого для проведения рутинных измерений.

Для приготовления усиленной пробы добавляют известное количество эталонного межлабораторного стандарта к образцу плазмы самцов контроля. Образец будет усиливаться до тех пор, пока ожидаемая концентрация вителлогенина не достигнет концентрации, в 10—100 раз превышающей ожидаемую концентрацию вителлогенина самцов рыб в контроле. Образец плазмы самцов контроля, в которой увеличена концентрация, может быть взят от индивидуальной рыбы или от нескольких рыб.

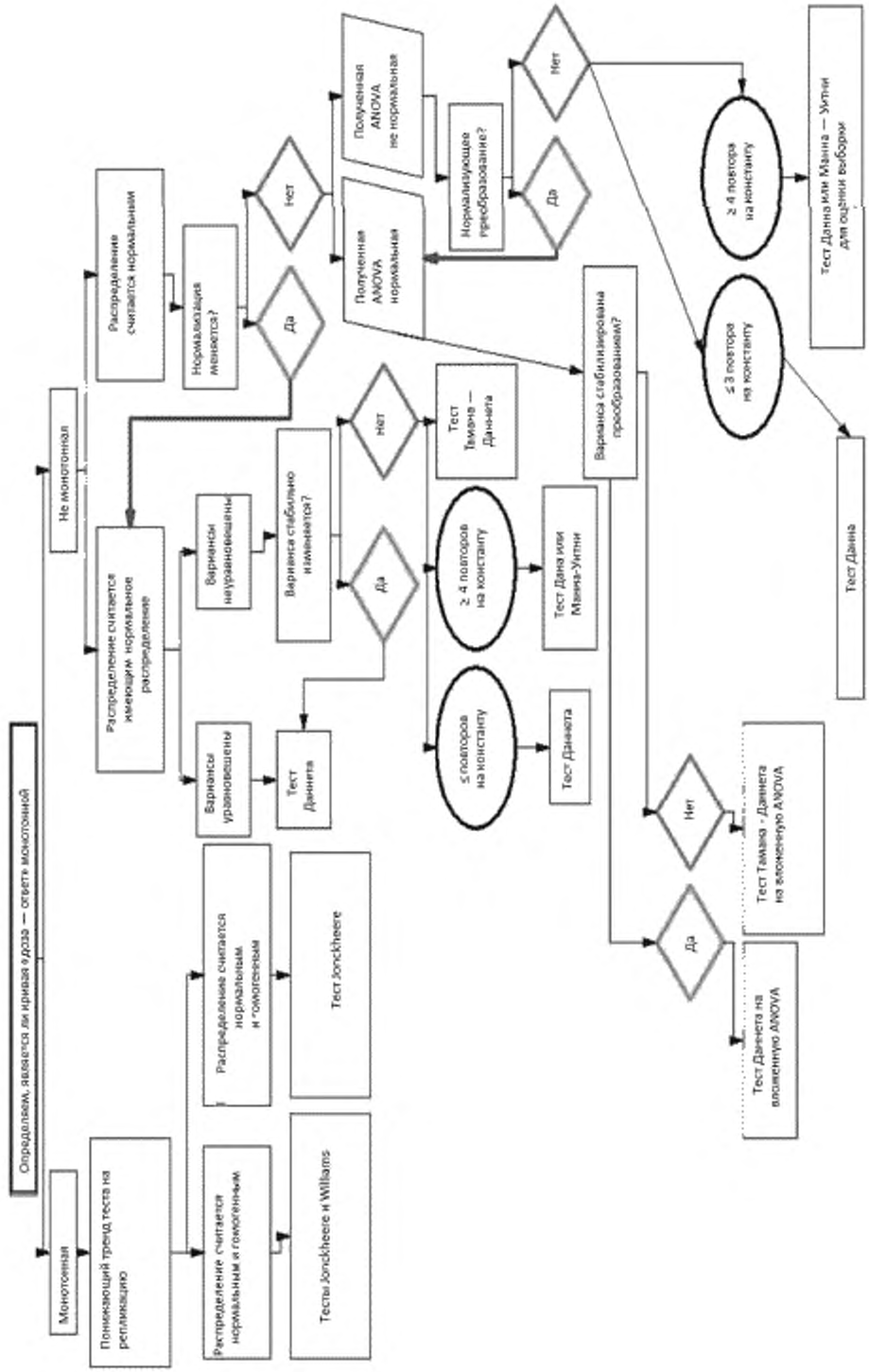
Часть плазмы самцов контроля неусиленной пробы анализируется в двух повторностях. Образец с увеличенной концентрацией также анализируется по крайней мере в двух повторностях. Средняя концентрация вителлогенина в образцах плазмы двух неусиленных концентраций самцов контроля добавляется к расчетному количеству вителлогенина в усиленных образцах для определения ожидаемой концентрации. Отношение этой расчетной концентрации к средневзвешенной указывают наряду с результатами для каждой серии анализов, выполненных в этот день.

Приложение J
(рекомендуемое)

Ординограмма статистического анализа

Таблица J.1

Determine whether Dose-Response is monotome	Определяют, если кривая «доза — ответ» монотонная
Monotone	Монотонная
Not monotone	Не монотонная
Step-down trend test on replicate means	Сравнение средних репликаций
Rep means normal & homogeneous	Средние репликации нормальные и гомогенные
Rep means not normal or not homogeneous	Средние репликации не нормальные и не гомогенные
Step-down Jonckheere or Williams' test	Тест Джонкира или Вильямса
Step-down Jonckheere test	Тест Джонкира
Rep means normally distributed	Нормальное распределение средних репликаций
Rep means not normally distributed	Не нормальное распределение средних репликаций
Variances equal	Дисперсии равны
Dunnett test	Тест Даннета
Variances unequal	Дисперсии не равны
Variance stabilizing transform?	Стабилизация измененных дисперсий?
<=3 reps per conc	≤ 3 повторности на концентрацию
>=4 reps per conc	≥ 4 повторности на концентрацию
Dunn Test	Тест Данна
Dunn or Mann-Whitney test	Тест Данна или Манна — Уитни
Tamhane-Dunnett test	Тест Тамана — Даннета
Normalizing transform?	Преобразования нормализованы?
Nested ANOVA normal	Нормальный иерархический дисперсионный анализ
Nested ANOVA not normal	Не нормальный иерархический дисперсионный анализ (ANOVA)
Dunnett test in nested ANOVA	Тест Даннета для иерархического дисперсионного анализа
Tamhane-Dunnett test on nested ANOVA	Тест Тамана — Даннета для иерархического дисперсионного анализа
Dunn Test on rep means	Тест Даннета для средних репликаций
Dunn or Mann-Whitney test on rep means	Тест Даннета или Манна — Уитни для средних репликаций


Определяем, является ли кривая «доза — ответ» монотонной
Монотонная
Не монотонная
Понимающий тренд теста на репликацию
Распределение считается нормальным и гомогенным
Тесты Jonckheere и Williams
Распределение считается нормальным и гомогенным
Тест Jonckheere
Распределение считается имеющим нормальное распределение
Распределение считается нормальным
Нормализация меняется?
Да
Нет
Вариансы уравновешены
Тест Даннета
Вариансы неуравновешены
Вариансы стабильно изменяется?
Да
Нет
Тест Тамана — Даннета
≥ 4 повторов на константу
Тест Дана или Манна-Уитни
≤ 3 повторов на константу
Тест Даннета
Полученная ANOVA нормальная
Полученная ANOVA не нормальная
Нормализующее преобразование?
Да
Нет
Вариансы стабилизирована преобразованием?
Да
Нет
Тест Даннета на вложенную ANOVA
Тест Тамана - Даннета на вложенную ANOVA
≥ 4 повтора на константу
≤ 3 повтора на константу
Тест Данна или Манна — Уитни для оценки выборки
Тест Данна

Библиография

[1] OECD (2006a) Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27

[2] OECD (2006b) Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29

[3] OECD (2007) Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25

[4] Owens JW (2007) Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. gost.e-ecolog.ru (accessed 18/09/08)

[5] US EPA 2007 Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Unpublished report dated 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 p.

[6] OECD, 2008 Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21

[7] Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review

[8] Pawlowski S., Sauer A., Shears J.A., Tyler C.R., Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91

[9] Andersen L., Goto-Kazato R., Trant J.M., Nash J.P., Korsgaard B, Bjerregaard P. (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52

[10] Ankley G.T., Kahl M.D., Jensen K.M., Hornung M.W., Korte J.J., Makynen E.A., Leino R.L. (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences;67(1):121-30

[11] Panter G.H., Hutchinson T.H., Hurd K.S., Sherren A., Stanley R.D., Tyler C.R. (2004). Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic

[12] Toxicology; 70(1):11-21

[13] Parks L.G., Cheek A.O., Denslow N.D., Heppell S.A., McLachlan J.A., LeBlanc G.A., Sullivan C.V. (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25

[14] Panter G.H, Tyler C.R., Maddix S., Campbell P.M., Hutchinson T.H., Länge R., Lye C., Sumpter J.P., 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows

[15] (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium

[16] Fenske M., van Aerle R.B., Brack S.C., Tyler C.R., Segner H. (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217—232

[17] Holbech H., Andersen L., Petersen G.I., Korsgaard B., Pedersen K.L., Bjerregaard P. (2001)

[18] Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119—131

[19] Rose J., Holbech H., Lindholst C., Noerum U., Povlsen A., Korsgaard B., Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531—539

[20] Brion F., Nilsen B.M., Eidem J.K., Goksoyr A., Porcher J.M. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699—1708

[21] Yokota H., Morita H., Nakano N., Kang I.J., Tadokoro H., Oshima Y., Honjo T., Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4: 87—98

[22] Tatarazako N., Koshio M., Hori H., Morita M. and Iguchi T. 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50: 301—308

[23] Ankley G.T., Jensen K.M., Makynen E.A., Kahl M.D., Korte J.J., Hornung M.W., Henry T.R., Denny J.S., Leino R.L., Wilson V.S., Cardon M.C., Hartig P.C., Gray L.E. (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350—1360

[24] Seki M., Yokota H., Matsubara H., Maeda M., Tadokoro H., Kobayashi K. (2004). Fish full lifecycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3): 774—781

[25] OECD (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

[26] Hutchinson T.H., Shillabeer N., Winter M.J., Pickford D.B., 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; p. 69—92

[27] Hutchinson T.H., Ankley G.T., Segner H., Tyler C.R., 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1: 106—114

[28] Miles-Richardson S.R., Kramer V.J., Fitzgerald S.D., Render J.A., Yamini B., Barbee S.J., Giesy J.P. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129—145

[29] Martinovic D., Blake L.S., Durhan E.J., Greene K.J., Kahl M.D., Jensen K.M., Makynen E.A., Villeneuve D.L. and Ankley G.T. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478—488

[30] OECD (2006c) Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/MONO(2006)18

[31] Thorpe K.L., Benstead R., Hutchinson T.H., Tyler C.R., 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*. 81, 90—98

УДК 658.382.3:006.354 МКС 71.040.50

Ключевые слова: химическая продукция, воздействие на окружающую среду, окружающая среда, биоразлагаемость, потребление кислорода, активный ил

Редактор *Е.И. Мосур*
Технические редакторы *В.Н. Прусакова, И.Е. Черепкова*
Корректор *Е.И. Рычкова*
Компьютерная верстка *Д.В. Кардановской*

Сдано в набор 28.10 2019. Подписано в печать 09.12.2019. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,19. Уч.-изд. л. 3,95.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ИД «Юриспруденция», 115419, Москва, ул. Орджоникидзе, 11
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов.
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru