

## TEIL B: METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT UND SONSTIGER AUSWIRKUNGEN AUF DIE GESUNDHEIT

### ALLGEMEINE EINLEITUNG: TEIL B

#### A. ERLÄUTERUNG

Zum Zweck dieser Einleitung gilt die folgende Nummerierung:

B.15 Genmutation - *Saccharomyces cerevisia*

B.16 Mitotische Rekombination - *Saccharomyces cerevisia*

B.17 In-vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen

B.18 DNS-Schädigung und -Reparatur - Unplanmäßige DNS-Synthese (UDS) - Säugetierzellen in vitro

B.19 In-vitro-Schwesterchromatidaustausch-Test

B.20 Test auf geschlechtsgebundene rezessive Letalmutationen an *Drosophila melanogaster*

B.21 In-vitro-Säuger-Zelltransformationstest

B.22 Dominant-Letal-Test an Nagern

B.23. SPERMATOGONIEN-CHROMOSOMENABERRATIONSTEST BEI SÄUGETIEREN

B.24 Maus-Fellfleckentest

B.25 Maus-Translokationstest

B.26 Prüfung auf subchronische Toxizität nach oraler Applikation: 90-Tage-Test mit Nagern

B.27 Prüfung auf subchronische Toxizität nach oraler Applikation: 90-Tage-Test mit Nichtnagern

B.28 Prüfung auf subchronische Toxizität nach dermalen Applikation: 90-Tage-Test mit Nagern

B.29 Prüfung auf subchronische Toxizität nach Inhalation: 90-Tage-Test mit Nagern

B.30 Prüfung auf chronische Toxizität

B.31 Prüfung auf Teratogenität - Nager und Nichtnager

B.32 Prüfung auf Karzinogenität

B.33 Kombinierte Prüfung auf chronische Toxizität/Karzinogenität

B.34 Prüfung auf Reproduktionstoxizität während einer Generation

B.35 Prüfung auf Reproduktionstoxizität während zwei Generationen

B.36 Toxikokinetik

#### B. ALLGEMEINE DEFINITIONEN DER IN DEN TESTMETHODEN IN DIESEM ANHANG VERWENDETEN BEGRIFFE

i) Akute Toxizität umfasst die schädigenden Wirkungen, die innerhalb eines bestimmten Zeitraums (gewöhnlich 14 Tage) nach Verabreichung einer Einzeldosis einer Substanz auftreten.

ii) Offensichtliche Toxizität ist ein allgemeiner Begriff zur Beschreibung deutlicher Toxizitätszeichen nach Verabreichung einer Prüfsubstanz. Diese Zeichen sollten für eine Bewertung der Gefährdung ausreichen und so schwerwiegend sein, daß bei einer Steigerung der verabreichten Dosis die Entwicklung schwerer Toxizitätszeichen und der wahrscheinliche Tod zu erwarten wären.

iii) Dosis ist die Menge der verabreichten Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Gewicht (Gramm oder Milligramm) oder als Gewicht der Prüfsubstanz pro Gewichtseinheit des Versuchstieres (z. B. mg/kg Körpergewicht) oder als konstante Futterkonzentration (parts per million oder mg/kg Futter) angegeben.

iv) Höchste nicht letale Dosis ('discriminating dose') ist die höchste von vier festgesetzten Dosisstufen, die verabreicht werden kann, ohne daß eine substanzbedingte Mortalität eintritt (einschließlich vorzeitiger Tötungen aus Tierschutzgründen).

v) Dosierung ist ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, die Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung einschließt.

vi) LD50 (mittlere Letaldosis) ist eine statistisch errechnete Einzeldosis einer Substanz, die voraussichtlich bei 50 % der exponierten Tiere zum Tode führt. Der LD50-Wert wird als Gewicht der Prüfsubstanz pro Gewichtseinheit des Versuchstieres (mg/kg Körpergewicht) angegeben.

- vii) LC50 (mittlere Letalkonzentration) ist eine statistisch errechnete Konzentration einer Substanz, die voraussichtlich bei 50 % der für eine bestimmte Zeit exponierten Tiere während der Exposition oder innerhalb eines bestimmten Zeitraums danach zum Tode führt. Der LC50-Wert wird als Gewicht der Prüfsubstanz pro Standardluftvolumen (mg/l) angegeben.
- viii) NOÄL ist die Abkürzung für 'no observed adverse effect level' und entspricht der höchsten Dosis oder Expositionskonzentration, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Befunde beobachtet werden.
- ix) Toxizität bei wiederholter Gabe/subchronische Toxizität umfasst die schädigenden Wirkungen, die bei Versuchstieren als Ergebnis wiederholter täglicher Verabreichung oder Exposition gegenüber einer chemischen Substanz auftreten. Die Behandlungsdauer erstreckt sich über eine kurze Zeit im Verhältnis zur spezießspezifischen Lebenszeit.
- x) Maximal verträgliche Dosis (maximum tolerated dose, MTD) ist die höchste Dosis, die bei Tieren Anzeichen einer Toxizität verursacht, ohne jedoch wesentliche Auswirkungen auf die Überlebenszeit der Tiere während der jeweiligen Testdauer zu zeigen.
- xi) Unter Hautreizung ist das Auslösen entzündlicher Veränderungen in der Haut nach Applikation einer Prüfsubstanz zu verstehen.
- xii) Unter Augenreizung ist das Auslösen von Veränderungen am Auge nach Applikation einer Prüfsubstanz auf die Oberfläche des Auges zu verstehen.
- xiii) Hautsensibilisierung (allergische Kontaktdermatitis) ist eine immunologisch vermittelte Hautreaktion auf eine Prüfsubstanz.
- xiv) Unter Hautverätzung ist das Auslösen einer irreversiblen Gewebeschädigung in der Haut nach Applikation einer Prüfsubstanz für die Dauer von 3 Minuten bis zu vier Stunden zu verstehen.
- xv) Toxikokinetik umfasst Untersuchungen zu Resorption, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung von Prüfsubstanzen.
- xvi) Resorption ist der Vorgang, durch den eine verabreichte Substanz in den Körper aufgenommen wird.
- xvii) Ausscheidung ist der Vorgang, durch den die verabreichte Substanz und/oder ihre Stoffwechselprodukte aus dem Körper ausgeschieden werden.
- xviii) Verteilung ist der Vorgang, durch den die resorbierte Substanz und/oder ihre Stoffwechselprodukte im Körper verteilt werden.
- xix) Stoffwechsel ist der Vorgang, durch den die verabreichte Substanz im Körper durch enzymatische oder nichtenzymatische Reaktionen in ihrer Struktur umgebaut wird.

#### B.I. Akute Toxizität, Toxizität bei wiederholter Gabe/subchronische Toxizität und chronische Toxizität

Die akuten toxischen Wirkungen sowie die Organ- oder Systemtoxizität einer Substanz kann anhand einer Reihe von Toxizitätsprüfungen (Methoden B.1 - B.5) bewertet werden, die nach einer Einzeldosis erste Rückschlüsse auf die Toxizität zulassen.

Je nach Toxizität der Substanz kann ein Limit-Test oder ein kompletter LD50-Test in Erwägung gezogen werden, auch wenn in Untersuchungen zur Inhalationstoxizität kein Limit-Test angegeben wird, da es nicht möglich war, einen einheitlichen Expositionsgrenzwert für die Inhalation festzulegen.

In Betracht gezogen werden sollten stets Methoden, die möglichst wenig Tiere benötigen und das Leiden der Tiere auf ein Minimum beschränken, wie zum Beispiel die Fest-Dosis-Methode (Methode B.1 bis) und die akute toxische Klasse (Methode B.1 tris). In Prüfungen der Stufe 1 kann eine Untersuchung an einer zweiten Spezies die aus der ersten Untersuchung gezogenen Schlußfolgerungen ergänzen. In diesem Fall kann eine Standardprüfmethode verwendet werden, oder die Methode kann für eine kleinere Anzahl von Tieren angepasst werden.

Die Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Gabe (Methoden B.7, B.8 und B.9) bewertet die toxischen Wirkungen bei wiederholter Exposition. Hierbei ist die Notwendigkeit einer sorgfältigen klinischen Beobachtung der Tiere zu unterstreichen, um möglichst viele Daten zu

gewinnen. Diese Prüfungen sollten dazu beitragen, die Zielorgane der toxischen Wirkungen sowie die toxischen und nichttoxischen Dosen zu ermitteln. Weitere eingehende Untersuchungen dieser Aspekte können in den Langzeitstudien erforderlich sein (Methoden B.26 - B.30 und B.33).

## B.II. Mutagenität, Gentoxizität

Mutagenität bezeichnet die Induktion permanenter vererbbarer Veränderungen in Menge oder Struktur des genetischen Materials von Zellen oder Organismen. Diese Veränderungen, sogenannte 'Mutationen', können ein einzelnes Gen oder Gensegmente, einen Genblock oder ganze Chromosomen betreffen. Die Wirkungen auf ganze Chromosomen können struktureller und/oder numerischer Art sein.

Die mutagene Wirkung einer Substanz wird durch In-vitro-Tests auf Gen-(Punkt-) Mutationen in Bakterien (Methode B.13/14) und/oder auf strukturelle Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen (Methode B.10) bewertet.

Akzeptabel sind auch In-vivo-Verfahren, z. B. der Mikronukleus-Test (Methode B.12) oder die Metaphasenanalyse von Knochenmarkzellen (Methode B.11). Allerdings sind, sofern keine besonderen Gründe dagegen sprechen, die In-vitro-Methoden unbedingt vorzuziehen.

Zusätzliche Prüfverfahren zur weiteren Untersuchung der Mutagenität oder als Vorab-Screening auf Karzinogenität können für höhere Produktionsvolumina und/oder zur Durchführung oder Nachbeobachtung einer Risikobewertung erforderlich sein. Diese können folgenden Zwecken dienen: Bestätigung von Ergebnissen aus Untersuchungen der Grundstufe, Untersuchung von Endpunkten, die in der Grundstufe nicht erfasst wurden, und Durchführung erster oder vertiefender In-vivo-Untersuchungen.

Für diese Zwecke umfassen die Methoden B.15 bis B.25 eukaryote In-vivo- und In-vitro-Systeme sowie eine grössere Zahl biologischer Endpunkte. Diese Prüfungen geben Aufschluß über Punktmutationen und weitere Endpunkte in Organismen, die komplexer sind als die in den Untersuchungen der Grundstufe verwendeten Bakterien.

Als allgemeines Prinzip gilt: Ein Programm zur weiteren Untersuchung der Mutagenität ist so aufzubauen, daß die Prüfungen zusätzliche relevante Informationen über das mutagene und/oder karzinogene Potential des jeweiligen Stoffes liefern.

Welche Untersuchungen jeweils in einem spezifischen Fall geeignet sind, hängt von zahlreichen Faktoren ab, z. B. den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Stoffes, den Ergebnissen der ersten bakteriellen und zytogenetischen Untersuchungen, dem Stoffwechselprofil der Substanz, den Ergebnissen anderer Toxizitätsprüfungen und den bekannten Verwendungszwecken des Stoffes. Ein starres Schema für die Auswahl der Prüfungen ist daher angesichts der Vielzahl der unter Umständen zu berücksichtigenden Faktoren nicht zweckmässig.

Einige allgemeine Grundsätze für die Prüfstrategie sind in der Richtlinie 93/67/EWG niedergelegt; klare Prüfvorgaben finden sich hingegen in den technischen Leitlinien zur Risikobewertung, die jedoch flexibel gehandhabt und nach Bedarf den jeweiligen Umständen angepasst werden können.

Die Methoden für weiterführende Untersuchungen sind im folgenden nach ihrem wichtigsten genetischen Endpunkt gruppiert:

Prüfungen zur Untersuchung von Gen-(Punkt-)Mutationen

- a) Vorwärts- oder Rückmutationstests unter Verwendung eukaryoter Mikroorganismen (*Saccharomyces cerevisia*) (Methode B.15)
- b) In-vitro-Tests zur Untersuchung von Vorwärtsmutationen in Säugetierzellen (Methode B.17)
- c) Tests auf geschlechtsgebundene rezessive Letalmutationen in *Drosophila melanogaster* (Methode B.20)
- d) In-vivo-Tests auf somatische Mutationen: Maus-Fellfleckentest (Methode B.24)

Prüfungen zur Untersuchung von Chromosomenaberrationen

- a) Zytogenetische In-vivo-Tests an Säugetieren; die In-vivo-Metaphasenanalyse von

Knochenmarkzellen sollte in Betracht gezogen werden, wenn sie nicht bereits im Rahmen der ersten Prüfungen durchgeführt wurde (Methode B.11). Ausserdem können Keimzellen in vivo zytogenetisch untersucht werden (Methode B.23).

b) Zytogenetische In-vitro-Tests an Säugetierzellen, soweit sie nicht bereits im Rahmen der ersten Prüfungen durchgeführt wurden (Methode B.10).

c) Dominant-Letal-Test bei Nagern (Methode B.22).

d) Tests auf vererbare Translokationen bei der Maus (Methode B.25).

Gentoxische Wirkungen - Wirkungen auf die DNS

Die Gentoxizität, die gekennzeichnet ist durch mögliche schädliche Wirkungen auf genetisches Material, die nicht notwendigerweise mit einer Mutagenität verbunden sind, kann durch eine induzierte Schädigung der DNS ohne direkte Belege für Mutationen angezeigt werden. Die folgenden Methoden auf der Basis von eukaryoten Mikroorganismen oder Säugetierzellen können für eine entsprechende Untersuchung geeignet sein:

a) Mitotische Rekombination in *Saccharomyces cerevisiä* (Methode B.16)

b) DNS-Schädigung und -Reparatur - ausserplanmässige DNS-Synthese - an Säugetierzellen in vitro (Methode B.18)

c) Schwesterchromatidaustausch in Säugetierzellen in vitro (Methode B.19)

Alternative Methoden zur Untersuchung des karzinogenen Potentials

Es stehen Zelltransformationstests zur Verfügung, die die Fähigkeit eines Stoffes messen, morphologische und verhaltensbedingte Veränderungen in Säugerzellkulturen auszulösen, die vermutlich mit malignen Transformationen in vivo verbunden sind (Methode B.21). Dazu lassen sich eine Reihe verschiedener Zelltypen und Transformationskriterien verwenden.

Bewertung des Risikos für erbliche Wirkungen in Säugetieren

Es stehen Verfahren zur Verfügung, um beim Säuger in vivo vererbare Schäden, die durch Gen-(Punkt-)Mutationen bedingt sind, zu untersuchen, z. B. der spezifische Genlocustest bei der Maus zur Erkennung von Keimzellmutationen in der ersten Generation (nicht in diesem Anhang enthalten), oder für Chromosomenaberrationen, z. B. der Test auf vererbare Translokationen bei der Maus (Methode B.25). Solche Verfahren können zur Abschätzung des potentiellen genetischen Risikos eines Stoffes für den Menschen herangezogen werden. Allerdings müssen angesichts der Komplexität dieser Prüfverfahren und der dazu benötigten sehr grossen Anzahl an Versuchstieren - was insbesondere für den spezifischen Genlocustest bei der Maus gilt - gute Gründe für die Durchführung dieser Prüfungen vorliegen.

B.III. Karzinogenität

Chemische Stoffe lassen sich, je nach dem vermuteten Wirkungsmechanismus, als gentoxische oder nicht gentoxische Karzinogene bezeichnen.

Erste Anhaltspunkte auf ein gentoxisches karzinogenes Potential einer Substanz lassen sich aus den Mutagenitäts-/Gentoxizitätstests ableiten. Weitere Hinweise ergeben sich aus den Toxizitätsprüfungen bei wiederholter Gabe sowie den Prüfungen auf subchronische oder chronische Toxizität. Die Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Gabe (Methode B.7) und Langzeitprüfungen bei wiederholter Gabe beinhalten die Untersuchung auf histopathologische Veränderungen, z. B. Hyperplasien in bestimmten Geweben, die von Bedeutung sein könnten. Diese Untersuchungen und toxikokinetische Daten können dazu beitragen, chemische Stoffe mit karzinogenem Potential aufzuspüren, die gegebenenfalls weitere eingehende Untersuchungen dieses Aspektes im Rahmen einer Prüfung auf Karzinogenität (Methode B.32) oder häufig im Rahmen einer kombinierten Prüfung auf chronische Toxizität/Karzinogenität (Methode B.33) erfordern.

B.IV. Reproduktionstoxizität

Die Reproduktionstoxizität lässt sich auf verschiedene Weise ermitteln, wie z. B. aufgrund einer Beeinträchtigung der männlichen und weiblichen Fortpflanzungsfunktionen bzw. -fähigkeit, d. h. also anhand der 'Wirkungen auf die Fertilität', oder aufgrund der Induktion nicht vererbbarer schädigender Wirkungen auf die Nachkommen, d. h. also anhand der 'Entwicklungstoxizität',

wobei teratogene Wirkungen sowie Wirkungen während der Laktation ebenfalls einbezogen sind.

Bei Teratogenitätsuntersuchungen im Rahmen der Prüfung auf Entwicklungstoxizität ist die Prüfmethode (Methode B.31) in erster Linie auf die orale Verabreichung ausgelegt. Alternativ dazu können, je nach den physikalischen Eigenschaften der Prüfsubstanz oder dem wahrscheinlichen Expositionsweg beim Menschen, auch andere Verabreichungswege untersucht werden. In diesen Fällen sollte die Prüfmethode unter Berücksichtigung der jeweiligen Kriterien des 28-Tage-Tests entsprechend angepasst werden.

Ist ein Drei-Generationen-Reproduktionstest (Fertilität) erforderlich, kann das für den Zwei-Generationen-Reproduktionstest beschriebene Verfahren (Methode B.35) auf eine dritte Generation ausgeweitet werden.

#### B.V. Neurotoxizität

Die Neurotoxizität lässt sich auf verschiedene Arten nachweisen, wie z. B. funktionelle Veränderungen und/oder biochemische Veränderungen im zentralen oder peripheren Nervensystem. Erste Hinweise auf eine Neurotoxizität sind den Prüfungen auf akute Toxizität zu entnehmen. Die Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Gabe (Methode B.7) beinhaltet die Untersuchung auf neurotoxikologische Wirkungen, wobei die Notwendigkeit einer sorgfältigen klinischen Beobachtung der Tiere zu unterstreichen ist, um möglichst viele Daten zu gewinnen. Die Methode sollte dazu beitragen, chemische Stoffe mit neurotoxischem Potential aufzuspüren, die dann gegebenenfalls eine eingehendere Untersuchung dieses Aspektes erfordern. Darüber hinaus gilt es aber auch, das Potential von Substanzen, spezifische neurotoxische Wirkungen hervorzurufen, die in anderen Toxizitätsprüfungen möglicherweise nicht erfasst werden, zu untersuchen. Bestimmte phosphororganische Verbindungen zum Beispiel können zu einer verzögerten Neurotoxizität führen; sie können anhand der Methoden B.37 und B.38 nach Einzelgabe oder wiederholter Gabe untersucht werden.

#### B.VI. Immuntoxizität

Die Immuntoxizität lässt sich auf verschiedene Arten nachweisen, wie z. B. durch Immunsuppression und/oder Steigerung der Ansprechbarkeit des Immunsystems mit resultierender Überempfindlichkeit oder induzierter Autoimmunität. Die Prüfung auf Toxizität bei wiederholter Gabe (Methode B.7) beinhaltet die Untersuchung auf immuntoxische Wirkungen. Die Methode sollte dazu beitragen, chemische Stoffe mit immuntoxischem Potential aufzuspüren, die dann gegebenenfalls eine eingehendere Untersuchung dieses Aspektes erfordern.

#### B.VII. Toxikokinetik

Toxikokinetische Untersuchungen sind für die Interpretation und Bewertung von Toxizitätsdaten hilfreich. Mit diesen Untersuchungen sollen bestimmte Aspekte der Toxizität der zu prüfenden chemischen Substanz geklärt werden. Die Ergebnisse können die Planung weiterer Toxizitätsuntersuchungen erleichtern. Es ist nicht vorgesehen, daß in jedem Fall sämtliche Parameter bestimmt werden müssen. Nur in seltenen Fällen ist das gesamte Repertoire der toxikokinetischen Untersuchungen (Resorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung) erforderlich. Bei bestimmten Verbindungen sind u. U. Änderungen dieser Reihenfolge ratsam; auch kann eine Prüfung mit nur einer Dosierung ausreichend sein (Methode B.36).

Informationen über die chemische Struktur (SAR) und physikalisch-chemische Eigenschaften können ebenfalls Rückschlüsse auf die Resorptionseigenschaften beim vorgesehenen Verabreichungsweg sowie auf die Stoffwechselforgänge und die Verteilung in den Geweben zulassen. Auch aus vorangegangenen toxikologischen und toxikokinetischen Untersuchungen liegen möglicherweise Informationen über toxikokinetische Parameter vor.

### C. CHARAKTERISIERUNG DER PRÜFSUBSTANZ

Die Zusammensetzung der Prüfsubstanz, einschließlich der Hauptverunreinigungen, ihre relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften sowie die Stabilität der Substanz müssen vor Beginn einer Toxizitätsuntersuchung bekannt sein.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz sind mitentscheidend für die Auswahl des Verabreichungsweges, die Art der einzelnen Prüfungen sowie für die Handhabung und Lagerung der Prüfsubstanz.

Der eigentlichen Untersuchung sollte daher die Entwicklung eines Analyseverfahrens zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Prüfsubstanz (möglichst einschließlich der Hauptverunreinigungen) im Verabreichungsmedium und im biologischen Material vorausgehen. Alle Angaben bezüglich der Identifikation, der physikalisch-chemischen Eigenschaften, der Reinheit und des Verhaltens der Prüfsubstanz sollten im Prüfbericht enthalten sein.

#### D. TIERPFLEGE

Eine strenge Kontrolle der Umweltbedingungen sowie eine den jeweiligen Tierarten angemessene Tierhaltung sind wesentliche Voraussetzungen für toxikologische Untersuchungen.

##### (i) Haltungsbedingungen

Die Umgebungsbedingungen in den Versuchstierräumen sind der jeweiligen Tierart anzupassen. Für Ratten, Mäuse und Meerschweinchen ist eine Raumtemperatur von  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30-70 % angezeigt; bei Kaninchen sollte die Temperatur  $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30-70 % betragen.

Einige Untersuchungsmethoden sind besonders empfindlich gegenüber Temperatureinflüssen. Für diese Fälle sind Einzelheiten über die entsprechenden Umgebungsbedingungen in der Beschreibung des Prüfverfahrens enthalten. Bei allen Untersuchungen auf toxische Wirkungen sind Temperatur und Luftfeuchtigkeit zu überwachen, aufzuzeichnen und in den Abschlußbericht der Untersuchung aufzunehmen.

Die Beleuchtung sollte künstlich sein und die Hell- und Dunkelphasen sollten sich im Abstand von 12 Stunden abwechseln. Einzelheiten des Beleuchtungsmusters sind aufzuzeichnen und in den Abschlußbericht der Studie aufzunehmen.

Sofern in der Beschreibung der Prüfmethode nichts anderes angegeben ist, sollten die Tiere einzeln oder in kleinen Gruppen aus Tieren desselben Geschlechts in Käfigen untergebracht sein. Bei Gruppenhaltung sollten maximal fünf Tiere in einem Käfig untergebracht sein.

In Berichten über Tierversuche ist unbedingt die Art der Käfighaltung sowie die Anzahl der in einem Käfig unterbrachten Tiere sowohl während der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz als auch während der darauf folgenden Beobachtungszeit anzugeben.

##### (ii) Fütterungsbedingungen

Das Futter muß allen ernährungswissenschaftlichen Anforderungen für die jeweils eingesetzte Spezies entsprechen. Werden den Tieren Prüfsubstanzen im Futter verabreicht, so kann der Nährwert durch Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Substanz und einem Futterbestandteil eingeschränkt sein. Die Möglichkeit einer solchen Reaktion muß bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Es kann herkömmliches Labortierfutter verwendet werden bei uneingeschränkter Versorgung mit Trinkwasser. Die Auswahl des Futters kann auch dadurch mitbestimmt werden, daß eine geeignete Beimischung der Prüfsubstanz gewährleistet sein muß, wenn die Prüfsubstanz auf diese Art verabreicht werden soll.

Verunreinigungen im Futter, die sich nachweislich auf die Toxizität auswirken, dürfen nicht in störenden Konzentrationen vorhanden sein.

#### E. SCHUTZ DER TIERE

Bei der Erarbeitung der Prüfverfahren wurde der Tierschutz in angemessener Weise berücksichtigt. Im folgenden werden einige Beispiele aufgeführt, doch ist die Liste nicht vollständig. Der genaue Wortlaut und/oder die genauen Bedingungen sind der Beschreibung der Prüfmethode zu entnehmen:

- Zur Bestimmung der akuten oralen Toxizität sind zwei alternative Verfahren, die sogenannte 'Fest-Dosis-Methode' oder die 'Methode der akuten toxischen Klasse' in Betracht zu ziehen. Bei der Fest-Dosis-Methode wird nicht der Tod als spezifischer Endpunkt verwendet und es werden weniger Tiere benötigt. Bei der 'Methode der akuten toxischen Klasse' werden im Durchschnitt 70 % weniger Tiere als bei der Methode B.1 zur Bestimmung der akuten oralen Toxizität

verwendet. Beide alternativen Verfahren führen zu weniger Schmerzen und Leiden bei den Versuchstieren als die klassischen Methoden.

- Die Anzahl der im Versuch verwendeten Tiere ist auf das wissenschaftlich annehmbare Minimum reduziert; für die Verfahren B.1 und B.3 werden lediglich fünf Tiere identischen Geschlechts pro Dosierung geprüft; für die Bestimmung der Sensibilisierung der Haut durch den Meerschweinchen-Maximierungstest (Methode B.6) werden lediglich 10 Tiere und für die negative Kontrollgruppe nur fünf Tiere benötigt. Die Anzahl der Tiere, die für die positive Kontrollgruppe bei der Prüfung der Mutagenität in vivo eingesetzt werden, wird ebenfalls gesenkt (Methoden B.11 und B.12).

- Die Tiere haben während der Tests weniger Schmerzen und Qualen zu erleiden: Tiere mit schweren und anhaltenden Zeichen von Schmerz können vorzeitig unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet werden; es brauchen keine Versuche mit Substanzdosen durchgeführt zu werden, von denen man weiß, daß sie aufgrund ihrer ätzenden oder reizenden Wirkungen starke Schmerzen oder Qualen verursachen (Methoden B.1, B.2 und B.3).

- Die Prüfung von für diese Versuche nicht relevanten hohen Dosierungen wird durch die Durchführung von Limit-Tests vermieden; dies gilt nicht nur für die Prüfung auf akute Toxizität (Methoden B.1, B.2 und B.3), sondern auch für die In-vivo-Mutagenitätstests (Methoden B.11 und B.12).

- Sofern ausreichende wissenschaftliche Nachweise dafür vorgelegt werden können, kann die Prüfung auf Reizungen gegebenenfalls entfallen bzw. auf eine Untersuchung an einem einzigen Tier beschränkt werden.

Diese wissenschaftlichen Erkenntnisse können sich auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, auf die Ergebnisse bereits durchgeführter anderer Prüfungen oder die Ergebnisse gut validierter In-vitro-Prüfungen stützen. Wenn z. B. eine Prüfung auf akute Toxizität bei dermalen Applikation mit der Limit-Testdosis der Substanz (Methode B.3) durchgeführt und dabei keine Hautreizung beobachtet wurde, kann sich eine weitere Prüfung auf Hautreizungen (Methode B.4) erübrigen. Substanzen, die sich in einer Prüfung auf Hautreizungen (Methode B.4) bereits eindeutig als ätzend oder schwer hautreizend erwiesen haben, sollten nicht weiter auf eine Augenreizwirkung geprüft werden (Methode B.5).

#### F. ALTERNATIVE PRÜFMETHODEN

Ein wissenschaftliches Ziel für die Europäische Union ist die Entwicklung und Validierung alternativer Verfahren, welche dieselben Informationen liefern können wie die gegenwärtigen Tierversuche, aber weniger Tiere erfordern, weniger Leiden verursachen oder die Verwendung von Tieren völlig überflüssig machen.

Solche Methoden müssen, sobald sie zur Verfügung stehen, nach Möglichkeit für die Charakterisierung von Gefahren und die anschließende Einstufung und Kennzeichnung im Hinblick auf substanzbezogene Gefahren in Betracht gezogen werden.

#### G. BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Bei der Auswertung und Interpretation von Tests sind gewisse Grenzen hinsichtlich der direkten Extrapolation der Ergebnisse der Tier- und In-vitro-Versuche auf den Menschen zu berücksichtigen; deshalb können Belege für unerwünschte Wirkungen beim Menschen, soweit solche vorliegen, zur Bestätigung der Versuchsergebnisse herangezogen werden.

Diese Ergebnisse können für die Einstufung und Kennzeichnung neuer und alter chemischer Stoffe bezüglich der Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit verwendet werden; die Grundlage dafür sind ihre charakteristischen Eigenschaften, die mit diesen Methoden identifiziert und quantifiziert werden. Die entsprechenden Kriterien in Anhang VI zur Einstufung und Kennzeichnung beziehen sich auch auf die Endpunkte der Prüfprotokolle dieser Testmethoden.

Diese Ergebnisse können auch für Studien zur Risikoabschätzung neuer und alter chemischer Stoffe genutzt werden, und geeignete Prüfstrategien für diese Zwecke sind in den entsprechenden Leitlinien angegeben.

## H. LITERATURHINWEISE

Die meisten dieser Methoden werden im Rahmen des ÖCD-Programms für Prüfrichtlinien entwickelt und sollten in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der guten Laborpraxis durchgeführt werden, um eine möglichst breite 'gegenseitige Datenakzeptanz' zu gewährleisten. Weitere Informationen finden sich in den in den ÖCD-Richtlinien genannten Literaturangaben sowie in der an anderen Stellen publizierten einschlägigen Literatur.



## B. 1 tris

### AKUTE TOXIZITÄT (ORAL) — AKUTE-TOXISCHE-KLASSEN METHODE

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Die Akute-Toxische-Klassen-Methode liefert Daten sowohl für die Gefahrenabschätzung als auch für die Gefahrenklassifikation.

Die Methode beruht auf drei festgelegten Dosen, die so abgestuft sind, daß sie die Klassifizierung einer Substanz anhand der Untersuchungsergebnisse ermöglichen. Darüber hinaus erlaubt das in dieser Prüfmethode beschriebene Verfahren die Auswahl von drei zusätzlichen festgelegten Dosen, die entweder als Alternativmöglichkeiten an bestimmten Entscheidungspunkten oder als Option für weitere Prüfungen genutzt werden können. Die Verwendung (einer) der zusätzlichen Dosen kann in Betracht gezogen werden für den Fall, daß eine weitere Verfeinerung der Untersuchung wünschenswert oder notwendig erscheint.

Bei dieser Methode werden definierte Anfangsdosen eingesetzt. Die Berechnung einer genauen  $LD_{50}$  ist nicht vorgesehen. Sie erlaubt aber die Bestimmung eines Expositionsbereiches, für den eine Letalität erwartet wird, da der Tod eines Teils der Tiere weiterhin der Hauptendpunkt der Prüfung darstellt. Die Ergebnisse der Prüfung sollten eine Klassifikation gemäß den Kriterien in Anhang VI erlauben. Aufgrund des sequentiellen Charakters des Verfahrens, kann die Prüfung länger dauern als das in B.1 beschriebene Verfahren. Der Hauptvorteil dieser Methode besteht darin, daß sie eine geringere Anzahl an Tieren erfordert als die Prüfung auf akute Toxizität (oral) (B.1.) und die alternative Fest-Dosis-Methode (B.1.bis).

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe Allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Prinzip der Prüfmethode

Die Prüfsubstanz wird oral in einer der festgelegten Dosen an eine Gruppe von Versuchstieren verabreicht. Die Prüfung erfolgt anhand eines schrittweisen Verfahrens, wobei in jedem Schritt drei Tiere eines Geschlechts verwendet werden. Eine vorausgehende Dosisfindungsstudie ist nicht erforderlich. Das Eintreten oder Nichteintreten von prüfsubstanzbedingten Todesfällen bei den in einem Schritt behandelten Tieren bestimmt über den nächsten Schritt, d. h.:

- ob keine weiteren Tests erforderlich sind;
- ob der nächste Schritt mit derselben Dosis, aber mit Tieren des anderen Geschlechts durchgeführt wird;
- ob der nächste Schritt mit der nächsthöheren oder der nächstniedrigeren Dosis durchgeführt wird.

##### 1.4. Beschreibung der Prüfmethode

###### 1.4.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Tiere werden nach Zufallskriterien ausgewählt, zur individuellen Identifizierung markiert und vor Beginn der Prüfung für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen gewöhnt. Die Tiere können nach Geschlecht und Dosis in Gruppen im Käfig gehalten werden, doch sollte die Anzahl der Tiere pro Käfig die Beobachtung der einzelnen Tiere nicht beeinträchtigen.

Die Prüfsubstanz wird den Tieren in einer einmaligen Dosis über eine Magensonde oder eine geeignete Intubationskanüle verabreicht.

Falls erforderlich, wird die Prüfsubstanz gelöst oder in einem geeigneten Vehikel suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zuerst eine wässrige Lösung/Suspension in Betracht zu ziehen, als zweite Wahl eine Lösung/Suspension in Öl (z. B. Maisöl) und als dritte Wahl eine mögliche Lösung in anderen Vehikeln zu verwenden. Bei nichtwässrigen Vehikeln sollten deren toxische Eigenschaften bekannt sein, und wenn dies nicht der Fall ist, vor der Prüfung bestimmt werden.

Die Tiere sollten vor der Verabreichung der Prüfsubstanz kein Futter erhalten (z. B. bei Ratten eine Futterkarenz über Nacht, bei Mäusen eine Futterkarenz von 3-4 Stunden). Trinkwasser sollte den Tieren nicht entzogen werden.

#### 1.4.2. *Prüfbedingungen*

##### 1.4.2.1. Versuchstiere

Soweit keine Gründe dagegen sprechen, ist die Ratte als Nagerspezies zu bevorzugen. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

Bei Beginn der Studie sollte die Schwankung des Körpergewichts der Tiere gering sein und nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom entsprechenden Mittelwert für jedes Geschlecht abweichen.

##### 1.4.2.2. Anzahl und Geschlecht

Für jeden Schritt werden drei Tiere eines Geschlechts verwendet. Im ersten Schritt können männliche oder weibliche Tiere verwendet werden.

##### 1.4.2.3. Dosierungen

Die zu verwendende Anfangsdosis sollte aus einer der drei festgelegten Dosisstufen, d. h. 25, 200 und 2 000 mg/kg Körpergewicht, ausgewählt werden. Als Anfangsdosis sollte die Dosis gewählt werden, die am wahrscheinlichsten zu Todesfällen bei mindestens einigen der behandelten Tiere führt. Je nach Anfangsdosis kann eines der Prüfschemata der in Anhang I beschriebenen Vorgehensweisen verwendet werden.

Bei der Auswahl des Geschlechts und der Anfangsdosis sollten alle verfügbaren Daten herangezogen werden, einschließlich Daten zur Struktur-Wirkungs-Beziehung. Wenn die Daten dafür sprechen, daß Todesfälle bei der höchsten Dosis (2 000 mg/kg Körpergewicht) unwahrscheinlich sind, sollte ein Limit-Test durchgeführt werden. Liegen keine Daten für eine Prüfsubstanz vor, empfiehlt es sich aus Tierschutzgründen, die Anfangsdosis von 200 mg/kg Körpergewicht zu verwenden.

Bisweilen kann es wünschenswert sein, differenziertere Ergebnisse zu erhalten, als anhand einer Prüfung mit den drei festen Dosisstufen von 25, 200 und 2 000 mg/kg Körpergewicht möglich ist. In diesen Fällen kann eine weitergehende Prüfung mit zusätzlichen Dosen von 5, 50 oder 500 mg/kg Körpergewicht in Erwägung gezogen werden.

Dosen, die aufgrund ätzender oder schwerer Reizwirkungen bekannterweise starke Schmerzen und Leiden verursachen, brauchen nicht verabreicht zu werden.

Der Zeitraum zwischen den Behandlungsphasen ist abhängig von Einsetzen, Dauer und Schweregrad der toxischen Zeichen. Mit der Behandlung von Tieren des anderen Geschlechts oder mit der nächsten Dosis sollte solange abgewartet werden, bis das Überleben der zuvor behandelten Tiere mit Sicherheit anzunehmen ist.

##### 1.4.2.4. Limit-Test

Ein Limit-Test mit einer Dosis von 2 000 mg/kg Körpergewicht kann mit drei Tieren jedes Geschlechts durchgeführt werden. Kommt es dabei zu behandlungsbedingten Todesfällen, sind gegebenenfalls weitere Tests mit 200 mg/kg (oder 500 mg/kg) Körpergewicht erforderlich.

##### 1.4.2.5. Beobachtungszeitraum

Die Tiere sollten normalerweise 14 Tage beobachtet werden, mit Ausnahme von Tieren, die aus der Studie genommen und aus Tierschutzgründen vorzeitig getötet werden oder tot aufgefunden werden. Die Dauer der Beobachtung sollte jedoch nicht starr festgelegt, sondern von der Art der toxischen Reaktionen, dem Zeitpunkt des Auftretens der Symptome und der Dauer der Erholungsphase abhängig gemacht werden. Die Beobachtungszeit kann somit verlängert werden, falls es sich als notwendig erweist. Der Zeitpunkt, zu dem die Toxizitätszeichen auftreten und wieder abklingen, ist von Bedeutung, insbesondere dann, wenn Anzeichen für ein verzögertes Auftreten von toxischen Zeichen erkennbar sind. Alle Beobachtungen werden systematisch und für jedes Versuchstier gesondert dokumentiert.

#### 1.4.3. *Versuchsdurchführung*

Im Anschluß an die Futterkarenz sollten die Tiere gewogen werden, bevor die Prüfsubstanz verabreicht wird. Nach Verabreichung der Prüfsubstanz kann das Futter für weitere 3-4 Stunden vorenthalten werden. Wenn eine Dosis in Teilmengen über einen bestimmten Zeitraum verabreicht wird, kann es erforderlich sein, den Tieren je nach Dauer dieses Zeitraums Futter und Wasser zu geben.

Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das bei jeder Gabe verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Bei Nagern sollte das Volumen normalerweise 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten; im Falle von wässrigen Lösungen können jedoch 2 ml/100 g Körpergewicht verabreicht werden. Die Variabilität der Prüfvolumina sollte durch Anpassung der Konzentration auf ein konstantes Volumen bei allen Dosen möglichst gering gehalten werden. Wenn eine Einmalgabe nicht möglich ist, kann die zu applizierende Dosis in Teilmengen über einen Zeitraum von maximal 24 Stunden gegeben werden.

Einzelheiten zum Prüfverfahren sind in Anhang I beschrieben.

#### 1.4.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Eine sorgfältige klinische Untersuchung sollte am Tag der Verabreichung mindestens zweimal, wenn es aufgrund der Reaktion der Tiere auf die Behandlung angezeigt ist auch häufiger, und an den folgenden Tagen mindestens einmal täglich vorgenommen werden. Moribunde Tiere oder Tiere, die offensichtlich unter starken Schmerzen leiden oder Anzeichen starker Qualen zeigen, sollten vorzeitig getötet werden. Aus Tierschutzgründen vorzeitig getötete Tiere werden bei der Auswertung wie Tiere behandelt, die im Verlauf der Prüfung behandlungsbedingt starben.

Werden Tiere aus Tierschutzgründen vorzeitig getötet oder werden Tiere tot aufgefunden, sollte der Todeszeitpunkt möglichst genau dokumentiert werden. Weitere Beobachtungen sind erforderlich, wenn die Tiere weiterhin toxische Zeichen aufweisen. Bei den Beobachtungen ist auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten sowie Atmung, Kreislauf, autonomes und zentrales Nervensystem, Somatomotorik und Verhaltensmuster zu achten. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Krämpfe, Salivation, Diarrhoe, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten.

Alle Beobachtungen werden systematisch und gesondert für jedes Tier dokumentiert.

#### 1.4.3.2. Körpergewicht

Alle Tiere sollten kurz vor Verabreichung der Prüfsubstanz und danach mindestens einmal wöchentlich gewogen werden. Gewichtsveränderungen sollten berechnet und aufgezeichnet werden. Die am Ende der Prüfung überlebenden Tiere werden gewogen und getötet.

#### 1.4.3.3. Autopsie

Alle Versuchstiere, einschließlich der während des Tests gestorbenen oder aus der Studie genommenen und getöteten Tiere, sollten einer makroskopischen Sektion unterzogen werden. Alle makroskopisch-pathologischen Veränderungen sind für jedes Tier zu dokumentieren. Eine mikroskopische Untersuchung von Organen mit Anzeichen pathologischer Veränderungen bei Tieren, die 24 Stunden oder länger überlebten, kann ebenfalls in Betracht gezogen werden, da sie möglicherweise brauchbare Informationen liefert.

### 2. DATEN

Die Daten für die einzelnen Tiere sollten dokumentiert werden. Ferner sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe die Anzahl der verwendeten Tiere, die Anzahl der Tiere mit Toxizitätszeichen, die Anzahl der Tiere, die während der Prüfung tot aufgefunden oder vorzeitig getötet wurde, der Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, eine Beschreibung und der zeitliche Verlauf der toxischen Wirkungen und deren Reversibilität sowie die Sektionsbefunde hervorgehen.

Eine Anweisung für die Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf die Klassifikation findet sich in Anhang 2.

### 3. ABSCHLUSSBERICHT

#### Prüfbericht

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

##### *Versuchstiere:*

- Spezies/Rasse;
- mikrobiologischer Status der Tiere, soweit bekannt;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltingsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, in den folgenden Wochen und am Ende der Prüfung.

##### *Prüfbedingungen:*

- Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz, einschließlich Applikationsvolumina und Zeitpunkt der Gabe;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität (einschließlich Art/Herkunft des Futters, Wasserquelle);
- Begründung für die Auswahl der Anfangsdosis.

*Ergebnisse:*

- Auflistung der Daten für jedes Tier nach Geschlecht und Dosis (Anzahl der Tiere mit toxischen Wirkungen, einschließlich Todesfälle, Art, Schweregrad und Dauer der Wirkungen);
- Beginn und zeitlicher Verlauf der toxischen Erscheinungen für jedes Tier mit Angaben darüber, ob die Wirkungen reversibel waren;
- Sektionsbefunde und ggf. histopathologische Befunde für jedes Tier.

*Diskussion der Ergebnisse.*

*Schlußfolgerungen.*

4. **LITERATUR**

Diese Methode entspricht der OECD TG 423.

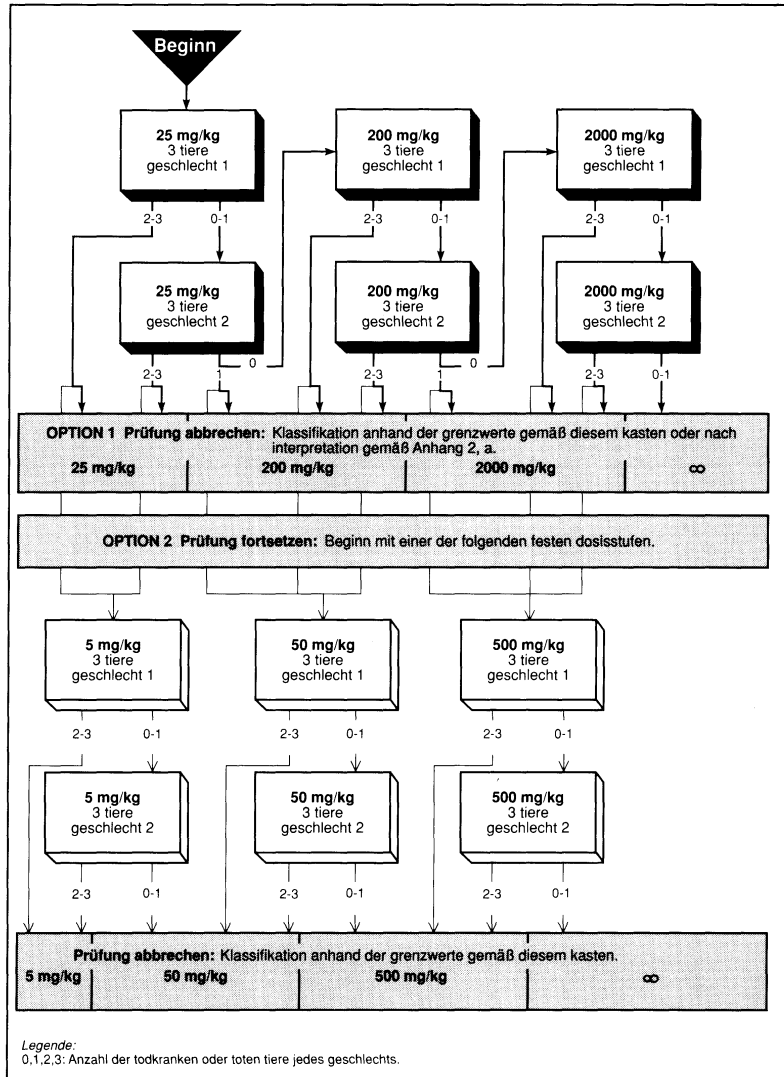
---

## ANHANG 1

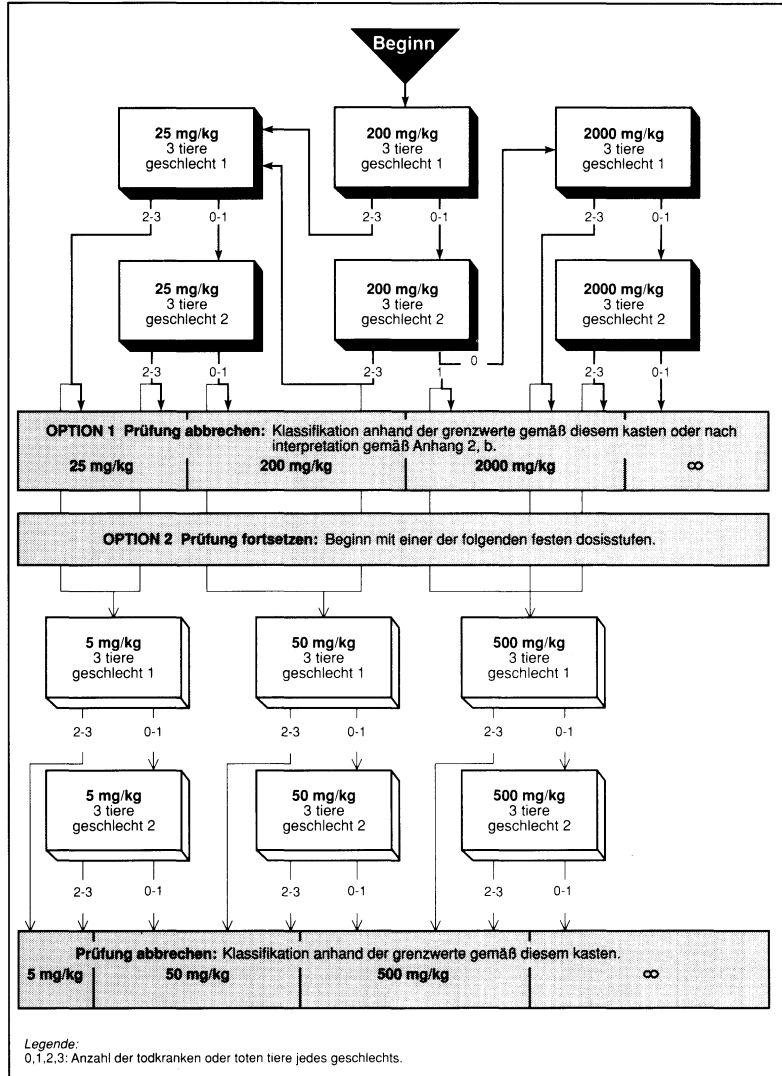
### TESTVERFAHREN

1. Wie unter Punkt 1.4.2.3 angegeben, sollte als Anfangsdosis die Dosis verwendet werden, die wahrscheinlich zu Todesfällen bei zumindest einigen der behandelten Tiere führt. Bei der Bestimmung der Anfangsdosis können folgende Informationen herangezogen werden:
  - Daten über physikalisch-chemische Eigenschaften der Prüfsubstanz;
  - Daten zur Struktur-Wirkungs-Beziehung;
  - alle Daten aus sonstigen Toxizitätsprüfungen;
  - die Art der vorgesehenen Anwendung der Prüfsubstanz.
2. Für jede Anfangsdosis ist das in diesem Anhang enthaltene jeweilige Prüfschema einzuhalten. Je nach Anzahl der vorzeitig getöteten bzw. gestorbenen Tiere folgt das Testverfahren den entsprechenden Pfeilen.
3. Wenn bei einer Anfangsdosis von 25 oder 200 mg/kg Körpergewicht nur ein Tier des zweiten Geschlechts stirbt, würde dies normalerweise weitere Prüfungen erübrigen. Werden jedoch bei den anderen fünf Tieren keine toxischen Zeichen beobachtet, ist bei der Sektion die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß der Tod des Tieres möglicherweise nicht durch die Prüfsubstanz bedingt war. In einem solchen Fall sollte die Prüfung mit der nächsthöheren Dosis fortgesetzt werden.
4. Wenn bei einer Dosis von 2000 mg/kg Körpergewicht ein Tier pro Geschlecht stirbt, liegt der  $LD_{50}$ -Wert voraussichtlich über 2000 mg/kg Körpergewicht. Da dieses Ergebnis jedoch ein Grenzfall ist, sollte die Wirkung bei den restlichen zwei Tieren jedes Geschlechts sorgfältig untersucht werden, und das Auftreten deutlicher, ausgeprägter toxischer Anzeichen bei diesen Tieren kann sehr wohl zu einer Klassifikation führen, die einem  $LD_{50}$ -Wert von 2000 mg/kg Körpergewicht oder weniger entspricht, oder würde weitere Prüfungen mit eben dieser Dosis rechtfertigen.
5. Das Verfahren ermöglicht die Prüfung in drei weiteren festgelegten Dosen (Option 2). Diese Möglichkeit könnte genutzt werden, um eine alternative Dosis an einem bestimmten Entscheidungspunkt zu wählen, oder für weitere Untersuchungen nach Abschluß der eigentlichen Prüfung (Option 1). Das Verfahren für Option 1 entspricht den fetten Pfeilen, das Verfahren für Option 2 den dünnen Pfeilen.

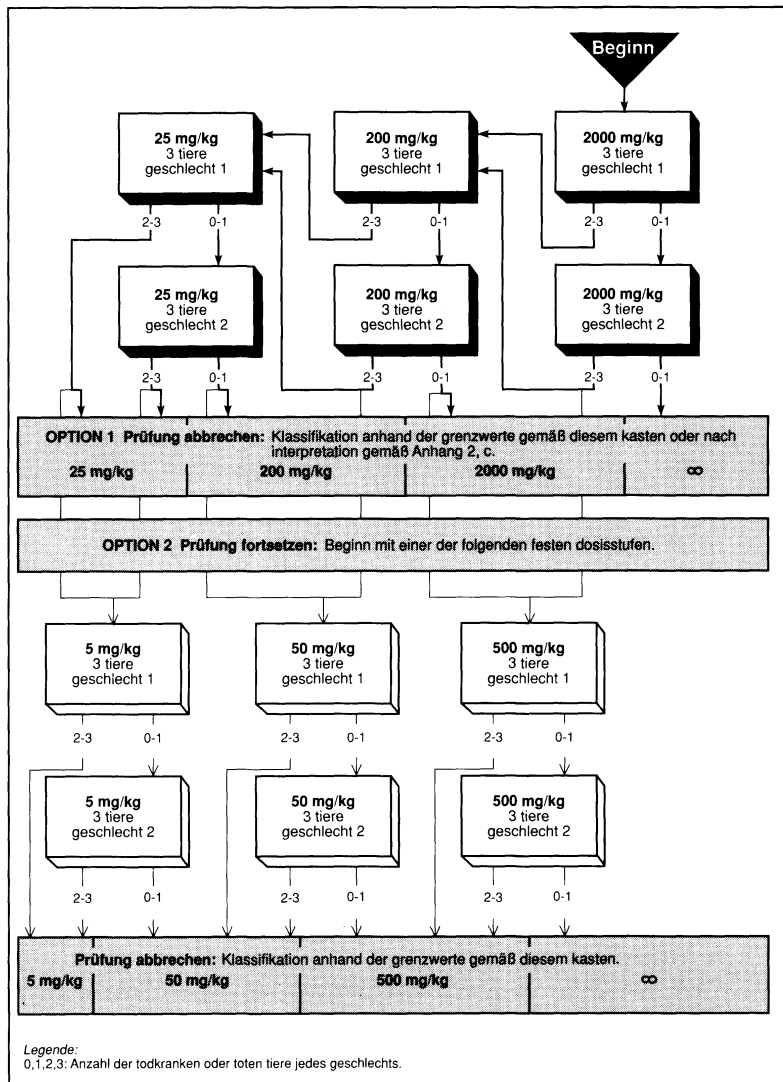
a) Prüfverfahren bei Anfangsdosis von 25 mg/kg Körpergewicht



b) Prüfverfahren bei Anfangsdosis von 200 mg/kg Körpergewicht



c) Prüfverfahren bei Anfangsdosis von 2000 mg/kg Körpergewicht





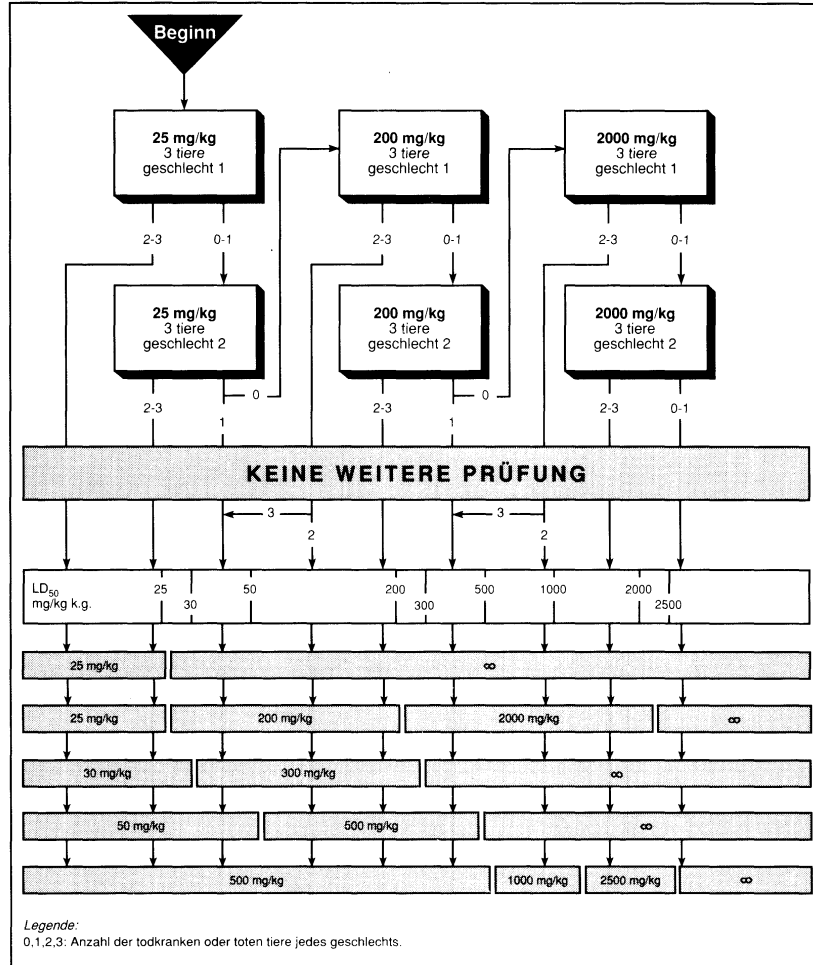
ANHANG 2

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE BEI PRÜFUNG NACH OPTION 1

Die grauen Kästchen unterhalb des Kastens „Keine weitere Prüfung“ in den Prüfschemata dieses Anhangs sind die Grenzwerte für die Klassifikation. Beim Prüfverfahren gemäß Option 1 ist dem entsprechenden Pfeil nach unten bis zum betreffenden grauen Kasten zu folgen.

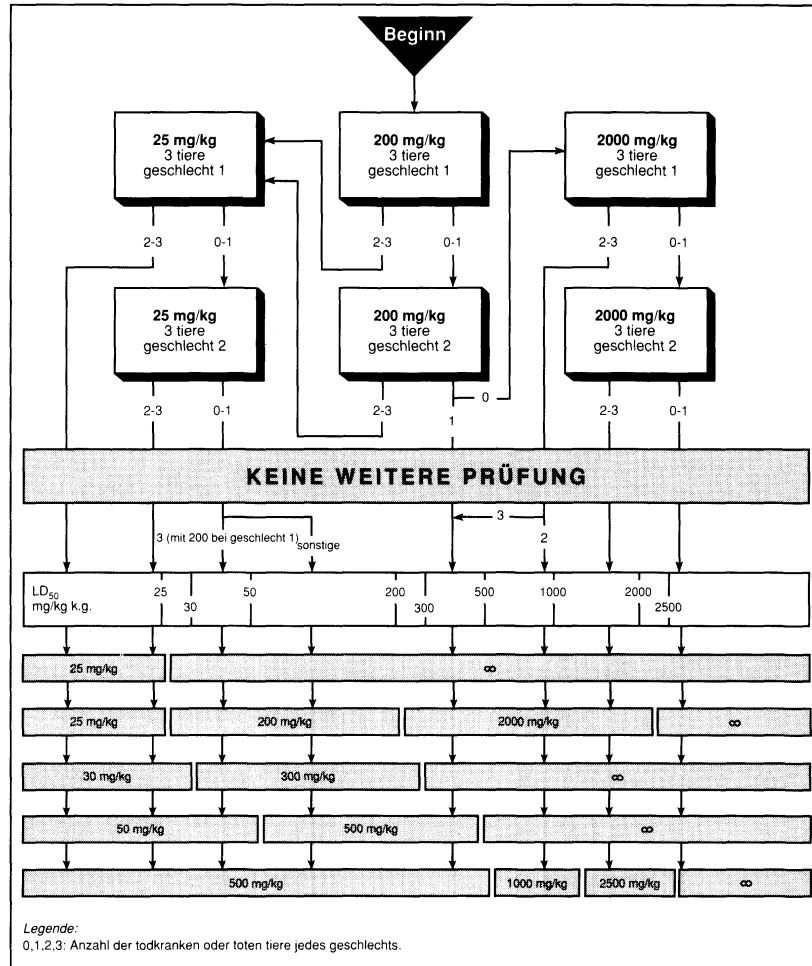
a) Interpretation der Ergebnisse bei Prüfung nach Option 1

Anfangsdosis: 25 mg/kg Körpergewicht



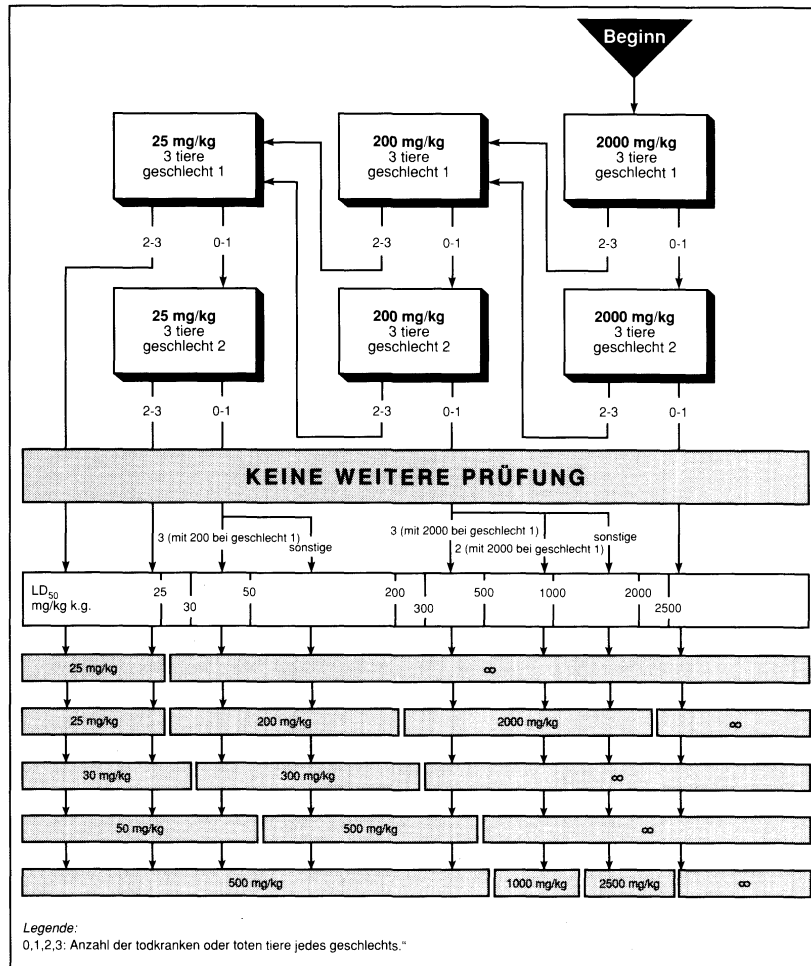
b) Interpretation der Ergebnisse bei Prüfung nach Option 1

Anfangsdosis: 200 mg/kg Körpergewicht



c) Interpretation der Ergebnisse bei Prüfung nach Option 1

Anfangsdosis: 2.000 mg/kg Körpergewicht



## B.2. AKUTE TOXIZITÄT (INHALATION)

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Es ist vorteilhaft, vorläufige Angaben zur Partikelgrößenverteilung, zum Dampfdruck, Schmelzpunkt, Siedepunkt, Flammpunkt und zur Explosivität (falls zutreffend) der Substanz zu haben.

Siehe auch allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt A).

#### 1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt B).

#### 1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Mehrere Versuchstiergruppen werden mit der Prüfsubstanz in abgestuften Konzentrationen für eine bestimmte Zeit exponiert, und zwar eine Konzentration je Gruppe. Anschließend werden die beobachteten Auswirkungen und Todesfälle registriert. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziiert.

Tiere mit schweren und anhaltenden Anzeichen von Leiden und Schmerzen können vorzeitig getötet werden. Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie auf diesem Wege aufgrund ihrer ätzenden oder stark reizenden Wirkungen ausgeprägte Schmerzen und Leiden verursachen, brauchen nicht geprüft zu werden.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

##### 1.6.1. Vorbereitung

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor dem Versuch werden gesunde junge erwachsene Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet. Eine simulierte Exposition ist nur dann erforderlich, wenn es die verwendete apparative Expositionsbedingung notwendig macht.

Bei festen Prüfsubstanzen kann eine Mikronisierung erforderlich sein, um Partikel einer geeigneten Größe zu erhalten.

Falls erforderlich, kann der Prüfsubstanz ein geeignetes Vehikel zugefügt werden, um die erforderliche Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen. In diesem Fall muß jedoch eine Kontrollgruppe, die nur das Vehikel enthält, eingesetzt werden. Wird der Dosierung zur Vereinfachung der Verabreichung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz eingefügt, müssen deren relevante toxische Eigenschaften bekannt sein. Es können ggf. Daten aus früheren Versuchen herangezogen werden.

##### 1.6.2. Prüfbedingungen

###### 1.6.2.1. Versuchstiere

Sofern nicht besondere Gründe vorliegen, ist die Ratte zu bevorzugen. Es sind bekannte Versuchstierstämme zu verwenden. Für jedes Geschlecht sollte die Schwankung des

Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs bei Versuchsbeginn nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom entsprechenden Mittelwert betragen.

#### 1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Nagetiere (5 weibliche und 5 männliche) sind für jede Konzentration zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

Anmerkung: Bei Prüfungen der akuten Toxizität an Tieren, die einer höheren Ordnung angehören als Nagetiere, sollte die Verwendung einer geringeren Anzahl an Tieren in Betracht gezogen werden. Die Dosierungen sollten sorgfältig ausgewählt und grosser Wert darauf gelegt werden, mässig toxische Dosierungen nicht zu überschreiten. Bei solchen Versuchen sollte die Verabreichung der Prüfsubstanz in letalen Dosen vermieden werden.

#### 1.6.2.3. Expositionskonzentrationen

Die Dosisgruppen (mindestens 3) müssen ausreichen, um nach entsprechenden Abstufungen Versuchsgruppen mit toxischen Wirkungen und Mortalitätsraten zu erhalten. Die erhaltenen Daten sollen ausreichend sein, um eine Konzentration-Mortalitäts-Kurve aufzuzeigen und - soweit möglich - eine annehmbare Bestimmung der LC50 erlauben.

#### 1.6.2.4. Limit-Test

Wenn eine Exposition an fünf männlichen und fünf weiblichen Tieren nach 20 mg/l eines Gases oder von 5 mg/l bei Aerosolen oder Stäuben über vier Stunden oder - in den Fällen, in denen dies wegen der physikalischen oder chemischen Eigenschaften einschließlich der Explosionsgefahr der Prüfsubstanz nicht möglich ist - die maximale erreichbare Konzentration bei Anwendung innerhalb von 14 Tagen keine substanzbedingte Mortalität herbeiführt, werden weitere Versuche nicht als notwendig erachtet

#### 1.6.2.5. Expositionszeit

Die Expositionszeit sollte vier Stunden betragen.

#### 1.6.2.6. Ausrüstung

Für die Tierversuche soll eine Inhalationsanlage benutzt werden, die einen dynamischen Luftstrom mit einem Luftwechsel von mindestens 12 mal pro Stunde sowie einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmässig verteilte Expositionsatmosphäre gewährleistet. Wird eine Kammer verwendet, so ist sie so zu gestalten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden und die Exposition durch Inhalation der Prüfsubstanz maximiert wird. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das "Gesamtvolumen" der Versuchstiere 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten. Für Expositionen des Mund-Nasen-Bereichs, des Kopfes oder des Ganzkörpers sind spezielle Inhalationskammern zu verwenden. Die beiden ersten Expositionsarten sollen dazu beitragen, die Aufnahme der Prüfsubstanz auf anderen Wegen soweit wie möglich einzuschränken.

#### 1.6.2.7. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 14 Tage betragen. Die Dauer der Beobachtung soll jedoch nicht starr festgelegt werden. Sie soll von der Art des Vergiftungsbildes, dem zeitlichen Auftreten der Symptome und der Dauer der Erholungsphase abhängig gemacht werden. Die Beobachtungszeit ist zu verlängern, falls es sich als notwendig erweist. Der Zeitpunkt, bei dem Vergiftungserscheinungen auftreten und wieder abklingen, sowie der Zeitpunkt des Todes sind von Bedeutung, vor allem dann, wenn Anzeichen für eine verzögerte Mortalität erkennbar sind.

### 1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere werden unmittelbar vor der Exposition gewogen und nach Einstellung des Gleichgewichts der Kammerkonzentration der Prüfsubstanz in der dazu bestimmten Apparatur über einen Zeitraum von vier Stunden ausgesetzt. Die Einstellung des Gleichgewichts sollte nur wenig Zeit in Anspruch nehmen. Die Temperatur soll während des Versuchs  $22 \pm 3$  C betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit soll zwischen 30 und 70 % gehalten werden, ausgenommen in den Fällen, wo dies nicht durchführbar ist (z. B. Versuche mit einigen Aerosolen). Das Aufrechterhalten eines leichten Unterdrucks in der Kammer (5 mm Wasser) verhindert das Entweichen der Prüfsubstanz in die Umgebung. Während der Exposition werden weder Futter noch Wasser verabreicht. Es soll ein geeignetes System zur Erzeugung und Überwachung der Prüfatmosfera benutzt werden. Das System soll gewährleisten, daß konstante Expositionsbedingungen so schnell wie möglich erreicht werden. Die Kammer sollte so angelegt sein und bedient werden, daß eine homogene Verteilung der Prüfatmosfera in der Kammer aufrechterhalten wird.

Die folgenden Messungen oder Überwachungen sollten durchgeführt werden:

(a) Messungen der Luftdurchflußrate (kontinuierlich)

(b) Die tatsächliche Konzentration der Prüfsubstanz wird während der Exposition im Atembereich mindestens dreimal gemessen (in einigen Atmosphärenarten, z. B. Aerosolen in hohen Konzentrationen, kann eine häufigere Überwachung notwendig sein). Während der Expositionsdauer sollte die Konzentration um nicht mehr als  $\pm 15$  % vom Mittelwert abweichen. Bei einigen Aerosolen ist dieses Prüfniveau möglicherweise nicht erreichbar. In diesem Fall wird ein größerer Streubereich akzeptiert. Für Aerosole ist eine Analyse der Partikelgröße so oft wie möglich durchzuführen (mindestens einmal pro Versuchsgruppe).

(c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit (möglichst ständig).

Während und nach der Exposition werden die Tiere beobachtet und die Befunde für jedes Tier aufgezeichnet. Die Beobachtungen sind während des ersten Tages häufig durchzuführen. Mindestens einmal an jedem Werktag sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung erfolgen. Andere tägliche Beobachtungen und entsprechende Vorkehrungen sollen dem Ziel dienen, den Verlust an Tieren für die Studie weitestgehend einzuschränken, z. B. durch Autopsie oder Kühlung tot aufgefundener Tiere bzw. durch Isolierung oder Tötung schwacher oder sterbender Tiere.

Diese Beobachtungen beinhalten Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, Atmung und Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie an der Somatomotorik und am Verhaltensmuster. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Atmung, Konvulsionen, Salivation, Diarrhö, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Der Zeitpunkt des Todes ist so genau wie möglich festzuhalten. Das Gewicht der Einzeltiere soll nach der Exposition wöchentlich und zum Zeitpunkt des Todes festgestellt werden.

Die während des Versuchs gestorbenen und die bis zum Abschluß des Versuchs überlebenden Tiere werden seziiert unter besonderer Berücksichtigung aller Veränderungen im oberen und unteren Atmungstrakt. Alle pathologischen Veränderungen sind zu protokollieren. Falls erforderlich, sollten Gewebe für eine histopathologische Untersuchung entnommen werden.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, der Zeitpunkt des Todes der einzelnen Tiere, die Zahl der Tiere mit weiteren Anzeichen der Giftwirkung, die Beschreibung der toxischen Auswirkungen und die Sektionsbefunde hervorgehen. Gewichtsveränderungen sind zu bestimmen und aufzuzeichnen, sofern die Tiere länger als einen Tag überleben. Tiere, die aufgrund substanzbedingter Leiden und Schmerzen vorzeitig getötet werden, werden als substanzbedingte Todesfälle registriert. Die LC50 ist mit einer anerkannten Methode zu berechnen. Die Auswertung sollte auch - soweit möglich - die Beziehung zwischen Verabreichungsdosis sowie Auftreten und Grad aller Abnormitäten einschließlich

Verhaltensänderungen, klinischer Symptome, schwerer Schädigungen, Körpergewichtsveränderungen, Mortalität und sonstiger toxikologischer Auswirkungen umfassen.

### 3. ABSCHLUSSBERICHT

#### 3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Versuchsbedingungen:

Beschreibung des Expositionsapparates einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Aerosolherzeugung, Klimatisierungssystem und Art der Unterbringung der Tiere in der Versuchskammer (wenn verwendet). Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Aerosolkonzentration sowie Teilchengrößenverteilung sind zu beschreiben.

Expositionsdaten

Diese Daten sind in tabellarischer Form zusammenzustellen und unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankungen (z. B. Standardabweichung) darzustellen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- (a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
- (b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
- (c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wurde, dividiert durch das Luftvolumen);
- (d) ggf. Art des Vehikels;
- (e) tatsächliche Konzentrationen im Atembereich;
- (f) der mittlere ärodynamische Massendurchmesser (Maß Median Ärodynamischer Durchmesser - MMAD) und die geometrische Standardabweichung (Geometric Standard Deviation - GSD);
- (g) Zeit für die Gleichgewichtseinstellung;
- (h) Expositionsdauer;
- Auflistung der Daten nach Geschlecht und Konzentration (Zahl der während des Versuchs gestorbenen oder getöteten Tiere; Zahl der Tiere mit Vergiftungserscheinungen; Zahl der exponierten Tiere);
- Zeitpunkt des Todes während oder nach Verabreichung der Prüfsubstanz, Gründe und Kriterien für das vorzeitige Töten der Tiere;
- sämtliche Beobachtungen;
- LC50-Wert für jedes Geschlecht, ermittelt am Ende der Beobachtungszeit (unter Angabe der Berechnungsmethode);
- 95 %-Vertrauensbereich für die LC50 (soweit möglich);
- Dosis/Mortalitätskurve und Slope-Faktor (falls durch die Bestimmungsmethode möglich);
- Sektionsbefunde;
- ggf. histopathologische Befunde;
- Diskussion der Ergebnisse (besondere Beachtung sollte dem Einfluß geschenkt werden, der das vorzeitige Töten von Tieren während des Versuchs auf den berechneten LC50-Wert haben kann);
- Interpretation der Ergebnisse.

#### 3.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt D).

#### 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt E).





## B.3. AKUTE TOXIZITÄT (DERMAL)

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt A).

#### 1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt B).

#### 1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird in abgestuften Dosierungen mehreren Versuchstiergruppen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe. Anschließend werden die beobachteten Vergiftungserscheinungen und Todesfälle registriert. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziert.

Tiere mit starken und anhaltenden Anzeichen von Leiden und Schmerzen können vorzeitig getötet werden; Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie auf diesem Wege aufgrund ihrer ätzenden oder reizenden Wirkungen ausgeprägte Schmerzen und Leiden verursachen, brauchen nicht geprüft zu werden.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

##### 1.6.1. Vorbereitung

Vor der Untersuchung werden die Tiere für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen in geeigneten Käfigen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde, junge erwachsene Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungsgruppen zugeordnet. Etwa 24 Stunden vor Versuchsbeginn wird das Fell der Versuchstiere auf dem Rücken durch Scheren oder Rasieren entfernt. Beim Scheren oder Abrasieren des Fells ist darauf zu achten, daß die Haut nicht verletzt wird, da dies zu einer Veränderung der Durchlässigkeit führen könnte. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation der Prüfsubstanz vorbereitet. Werden feste Stoffe verwendet, die gegebenenfalls pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder ggf. einem geeigneten Vehikel angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut sicherzustellen. Bei der Verwendung eines Vehikels ist dessen Einfluß auf das Eindringen der Prüfsubstanz in die Haut zu berücksichtigen. Flüssige Prüfsubstanzen werden im allgemeinen unverdünnt angewendet.

##### 1.6.2. Prüfbedingungen

###### 1.6.2.1. Versuchstiere

Es können erwachsene Ratten oder Kaninchen verwendet werden. Auch andere Tierarten können verwendet werden, jedoch muß ihre Verwendung begründet werden. Es sollen bekannte Versuchstierstämme verwendet werden. Für jedes Geschlecht sollte die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs bei Versuchsbeginn nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom entsprechenden Mittelwert betragen.

#### 1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 5 Tiere sind für jede Konzentration zu verwenden. Sie sollten alle vom gleichen Geschlecht sein. Wenn weibliche Tiere benutzt werden, dürfen diese weder geworfen haben noch trächtig sein. Wenn es Hinweise darauf gibt, daß ein Geschlecht deutlich empfindlicher reagiert, sollten Tiere dieses Geschlechts verwendet werden.

Anmerkung: Bei Prüfungen der akuten Toxizität an Tieren, die einer höheren Ordnung angehören als Nagetiere, sollte die Verwendung einer geringeren Anzahl an Tieren in Betracht gezogen werden. Die Dosierungen sollten sorgfältig ausgewählt und grosser Wert darauf gelegt werden, mässig toxische Dosierungen nicht zu überschreiten. Bei solchen Versuchen sollte die Verabreichung der Prüfsubstanz in letalen Dosen vermieden werden.

#### 1.6.2.3. Dosierungen

Die Dosisgruppen (mindestens 3) sollten ausreichen, um nach entsprechenden Abstufungen Versuchsgruppen mit unterschiedlichen toxischen Wirkungen und Mortalitätsraten zu erhalten. Bei der Festlegung der Dosierungen sollte eine mögliche reizende oder ätzende Wirkung berücksichtigt werden. Die erhaltenen Daten sollten ausreichen, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve aufzuzeigen und - soweit möglich - eine annehmbare Bestimmung der LD50 erlauben.

#### 1.6.2.4. Limit-Test

Es kann ein Limit-Test mit einer einzigen Dosierung von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht an einer Gruppe von 5 männlichen und 5 weiblichen Tieren unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren durchgeführt werden. Wenn substanzbedingte Todesfälle festgestellt werden, sollte ein vollständiger Test erwogen werden.

#### 1.6.2.5. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 14 Tage betragen. Die Dauer der Beobachtung soll jedoch nicht starr festgelegt werden. Sie soll von der Art des Vergiftungsbildes, dem zeitlichen Auftreten der Symptome und der Dauer der Erholungsphase abhängig gemacht werden. Die Beobachtungszeit ist zu verlängern, falls es sich als notwendig erweist. Der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungserscheinungen auftreten und wieder abklingen, ihre Dauer sowie der Zeitpunkt des Todes sind von Bedeutung, vor allem dann, wenn Anzeichen für eine verzögerte Mortalität erkennbar sind.

#### 1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere sollen einzeln in Käfigen gehalten werden. Die Prüfsubstanz ist einheitlich auf einen Bereich aufzutragen, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein; es sollte jedoch ein möglichst grosser Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht behandelt werden.

Die Prüfsubstanz muß während einer Expositionszeit von 24 Stunden mittels eines porösen Mullverbandes und eines nicht reizenden Pflasters Kontakt mit der Haut haben. Die Versuchsfläche ist ausserdem auf geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, daß die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können. Es können auch Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden, damit die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können; eine vollständige Immobilisierung ist jedoch nicht zu empfehlen.

Nach Ablauf der Expositionszeit werden die Reste der Prüfsubstanz entfernt, soweit möglich unter Verwendung von Wasser oder mit einem anderen geeigneten Hautreinigungsverfahren. Die Beobachtungen sind systematisch aufzuzeichnen. Für jedes Tier sind individuelle Aufzeichnungen anzufertigen. Am ersten Tag sind die Tiere häufig zu beobachten. Mindestens

einmal pro Werktag sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung erfolgen. Andere tägliche Beobachtungen und entsprechende Vorkehrungen sollen dem Ziel dienen, den Verlust an Tieren für die Studie weitestgehend einzuschränken, z. B. durch Autopsie oder Kühlung tot aufgefundener Tiere und durch Isolierung oder Tötung schwacher oder sterbender Tiere. Die Beobachtungen beinhalten Veränderungen von Fell, behandelter Haut, Augen, Schleimhäuten, Atmung und Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie an der Somatomotorik und am Verhaltensmuster. Besonderes Augenmerk ist auf Tremor, Konvulsionen, Salivation, Diarrhö, Lethargie, Schlaf und Koma zu richten. Der Zeitpunkt des Todes ist so genau wie möglich festzuhalten. Die während des Versuchs gestorbenen und die bis zum Abschluß des Versuchs überlebenden Tiere werden seziert. Alle pathologischen Veränderungen sind zu protokollieren. Falls erforderlich, sollten Gewebe für eine histopathologische Untersuchung entnommen werden.

Bewertung der Toxizität beim jeweils anderen Geschlecht

Nach Beendigung des Versuchs mit Tieren eines bestimmten Geschlechts wird die Prüfsubstanz mindestens einer Gruppe von 5 Tieren des jeweils anderen Geschlechts verabreicht, um festzustellen, ob Tiere dieses Geschlechts nicht deutlich empfindlicher auf die Substanz reagieren. Unter bestimmten Bedingungen kann die Verwendung einer geringeren Anzahl von Tieren gerechtfertigt sein. Wenn ausreichend Hinweise dafür vorliegen, daß die Tiere des geprüften Geschlechts deutlich empfindlicher reagieren, kann auf eine Prüfung der Tiere des jeweils anderen Geschlechts verzichtet werden.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, der Zeitpunkt des Todes der einzelnen Tiere, die Zahl der Tiere mit weiteren Anzeichen der Giftwirkung, die Beschreibung der toxischen Wirkungen und die Sektionsbefunde hervorgehen. Die Bestimmung des Gewichts der einzelnen Tiere erfolgt unmittelbar vor Verabreichung der Prüfsubstanz, danach in wöchentlichen Abständen und zum Zeitpunkt des Todes. Gewichtsveränderungen sind zu bestimmen und aufzuzeichnen, sofern die Tiere länger als einen Tag überleben. Tiere, die aufgrund substanzbedingter Leiden und Schmerzen vorzeitig getötet werden, werden als substanzbedingte Todesfälle registriert. Die LD50 ist mit einer anerkannten Methode zu berechnen.

Die Auswertung sollte auch - soweit vorhanden - die Beziehung zwischen Verabreichungsdosis sowie Auftreten und Schweregrad aller Abnormitäten einschließlich Verhaltensänderungen, klinischer Symptome, schwerer Schäden, Körpergewichtsveränderungen, Mortalität und sonstiger toxikologischer Wirkungen umfassen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter, usw.;
- Versuchsbedingungen (einschließlich des Hautreinigungsverfahrens und der Art des Verbandes: okklusiv oder semi- okklusiv);
- Dosierungen (ggf. mit Vehikel, falls verwendet, und Konzentrationen);
- Geschlecht der behandelten Tiere;
- Auflistung der Daten nach Geschlecht und Dosierung (Zahl der während des Versuchs gestorbenen oder getöteten Tiere, Zahl der Tiere mit Vergiftungserscheinungen, Zahl der exponierten Tiere);
- Zeitpunkt des Todes nach Auftragen der Prüfsubstanz, Gründe und Kriterien für das vorzeitige Töten der Tiere;

- sämtliche Beobachtungen;
- LD50-Wert für das Geschlecht, das einem vollständigen Versuch unterzogen wurde, Bestimmung nach 14 Tagen (unter Angabe der Berechnungsmethode);
- 95 %-Vertrauensbereich für die LD50 (soweit möglich);
- Dosis/Mortalitätskurve und Slope-Faktor (falls durch die Bestimmungsmethode möglich);
- Sektionsbefunde;
- ggf. histopathologische Befunde;
- ggf. Ergebnisse aus Versuchen mit Tieren des jeweils anderen Geschlechts;
- Diskussion der Ergebnisse (besondere Beachtung sollte dem Einfluß geschenkt werden, der das vorzeitige Töten von Tieren während des Versuchs auf den errechneten LD50-Wert haben kann);
- Interpretation der Ergebnisse.

### 3.2. Bewertung und Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt D).

### 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt E).

## B. 6 SENSIBILISIERUNG DER HAUT

### 1. METHODE

#### 1.1. Einleitung

##### *Bemerkungen:*

Die Empfindlichkeit und Fähigkeit von Tests, potentielle Sensibilisatoren der menschlichen Haut zu ermitteln, sind von besonderer Bedeutung für ein Klassifizierungssystem der Toxizität im Bereich des öffentlichen Gesundheitswesens.

Es gibt kein alleiniges Prüfverfahren, das geeignet ist, alle Substanzen mit einer potentiellen Sensibilisierungswirkung auf die menschliche Haut hinreichend zu ermitteln, und das zudem für alle Substanzen relevant ist.

Bei der Auswahl eines Tests sind Faktoren wie die physikalischen Eigenschaften einer Substanz, einschließlich ihrer Fähigkeit, die Haut zu durchdringen, zu berücksichtigen.

Es wurden zwei Arten von Tests mit Meerschweinchen entwickelt: die Adjuvans-Tests, bei denen ein allergischer Zustand durch Auflösung oder Suspension der Prüfsubstanz im kompletten Freundschens Adjuvans (FCA) potenziert wird, und die Tests ohne Adjuvans.

Die Adjuvans-Tests haben bei der Bestimmung einer wahrscheinlichen Hautsensibilisierungswirkung einer Substanz beim Menschen voraussichtlich eine größere Vorhersagewahrscheinlichkeit als Methoden ohne das komplette Freundschens Adjuvans. Sie sind daher die bevorzugten Tests.

Bei dem Maximierungstest am Meerschweinchen (GPMT) handelt es sich um ein weitverbreitetes Adjuvans-Verfahren. Obwohl es noch zahlreiche andere Verfahren gibt, mit deren Hilfe sich feststellen läßt, ob eine Substanz eine Sensibilisierungsreaktion der Haut hervorzurufen vermag, gilt der GPMT als der bevorzugte Adjuvans-Test.

Bei zahlreichen chemischen Substanzklassen gelten die Tests ohne Adjuvans (von denen der Bühler-Test der bevorzugte ist) als weniger empfindlich.

In bestimmten Fällen kann es gute Gründe für die Wahl des Bühler-Tests geben, bei dem die äußerliche Applikation Anwendung findet, anstelle der intradermalen Injektion beim Maximierungstest am Meerschweinchen. Die Anwendung des Bühler-Tests sollte wissenschaftlich begründet werden.

In der vorliegenden Methode werden der Meerschweinchen-Maximierungstest (GPMT) und der Bühler-Test beschrieben. Andere Tests können verwendet werden, sofern sie gut validiert sind und eine wissenschaftliche Begründung gegeben wird.

Wenn ein positives Ergebnis mit einem anerkannten Screening-Test erhalten wird, kann eine Testsubstanz als potentiell sensibilisierend bewertet werden. Somit kann ein weiterer Test mit Meerschweinchen nicht notwendig sein. Wird aber ein negatives Ergebnis mit einem Screening-Test erhalten, ist ein Test mit Meerschweinchen entsprechend dem hier beschriebenen Verfahren durchzuführen.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2. Definitionen

*Hautsensibilisierung:* (allergische Kontaktdermatitis) immunologisch vermittelte Hautreaktion auf eine Substanz. Beim Menschen kann die Reaktion gekennzeichnet sein durch Pruritus, Erytheme, Ödeme, Papula, Vesiculae, Bullae oder eine Kombination dieser Erscheinungen. Bei anderen Spezies können die Reaktionen anderer Art sein und nur aus Erythemen und Ödemen bestehen.

*Induktionsexposition:* experimentelle Exposition eines Probanden gegenüber einer Prüfsubstanz mit der Absicht, eine Überempfindlichkeit zu induzieren.

*Induktionsphase:* Zeitraum von mindestens einer Woche nach einer Induktionsexposition, während dem sich eine Überempfindlichkeit entwickeln kann.

*Provokationsexposition:* experimentelle Exposition eines zuvor behandelten Tieres gegenüber einer Prüfsubstanz nach einer Induktionsphase, um zu bestimmen, ob das Tier überempfindlich reagiert.

### 1.3. Bezugssubstanzen

Die Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des verwendeten Testverfahrens sollte alle sechs Monate unter Verwendung von Substanzen mit bekannten leichten bis mittelgradigen hautsensibilisierenden Eigenschaften überprüft werden.

In einem ordnungsgemäß durchgeführten Test ist bei leichten/mittelgradigen Sensibilisatoren eine Reaktion von mindestens 30 % (Adjuvans-Test) bzw. mindestens 15 % (Test ohne Adjuvans) zu erwarten.

Die folgenden Substanzen werden bevorzugt:

CAS-Nummer	EINECS-Nummer	EINECS-Bezeichnungen	Freinamen
101-86-0	202-983-3	$\alpha$ -Hexylcinnamaldehyd	$\alpha$ -Hexyl-cinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	Benzothiazol-2-thiol (Mercapto-benzothiazol)	Kaptax
94-09-7	202-303-5	Benzocain	Norcain

Unter bestimmten Umständen können bei entsprechender Begründung andere Kontrollsubstanzen, die die obigen Kriterien erfüllen, verwendet werden.

### 1.4. Prinzip der Prüfmethode

Die Versuchstiere werden zunächst durch intradermale Injektion und/oder epidermale Applikation der Prüfsubstanz ausgesetzt (Induktionsexposition). Nach einer Ruhephase von 10 bis 14 Tagen (Induktionsphase), in deren Verlauf sich eine Immunreaktion entwickeln kann, werden die Tiere einer Provokationsdosis ausgesetzt. Ausmaß und Grad der Hautreaktion auf die Provokationsexposition bei den Versuchstieren wird mit der Reaktion bei Kontrolltieren verglichen, die einer Scheininduktion unterzogen wurden und die Provokationsexposition erhalten.

### 1.5. Beschreibung der Prüfmethode

Wenn die Entfernung der Prüfsubstanz für notwendig erachtet wird, sollte dies mit Hilfe von Wasser oder einem geeigneten Lösungsmittel geschehen, ohne daß die vorhandene Reaktion bzw. die Unversehrtheit der Epidermis beeinträchtigt wird.

#### 1.5.1. Meerschweinchen-Maximierungstest (GPMT)

##### 1.5.1.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Albino-Meerschweinchen werden vor dem Test für die Dauer von mindestens 5 Tagen an die Laborbedingungen akklimatisiert. Vor Testbeginn werden die Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Behaarung wird je nach Prüfmethode durch Scheren, Rasieren oder, falls möglich, chemische Enthaarung, entfernt. Dabei ist darauf zu achten, daß es nicht zu Hautabschürfungen kommt. Die Tiere werden vor Testbeginn und nach Abschluß des Tests gewogen.

##### 1.5.1.2. Versuchsbedingungen

###### 1.5.1.2.1. Versuchstiere

Es werden gängige Laborstämme des Albino-Meerschweinchens verwendet.

###### 1.5.1.2.2. Anzahl und Geschlecht

Es können männliche und/oder weibliche Tiere verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

Die behandelte Gruppe besteht aus mindestens 10 Tieren, die Kontrollgruppe aus mindestens 5 Tieren. Wenn weniger als 20 Tiere in der Prüfgruppe und 10 Tiere in der Kontrollgruppe verwendet wurden und es nicht möglich ist, zu entscheiden, ob die Prüfsubstanz sensibilisierend wirkt, sind Prüfungen an weiteren Tieren unbedingt zu empfehlen, bis insgesamt mindestens 20 Tiere in der Prüfgruppe und 10 Kontrolltiere getestet sind.

#### 1.5.1.2.3. Dosierungen

Die für jede Induktionsexposition verwendete Konzentration der Prüfsubstanz sollte systemisch gut verträglich sein, und es sollte sich um die höchste Dosis handeln, die noch eine leichte bis mittelgradige Hautreizung hervorruft. Die für die Provokationsexposition verwendete Konzentration sollte die höchste nicht reizende Dosis sein. Wenn notwendig, können die entsprechenden Konzentrationen mit einer Pilotstudie unter Verwendung von zwei bis drei Tieren ermittelt werden. Für diesen Zweck kommt die Verwendung von FCA-behandelten Tieren in Betracht.

#### 1.5.1.3. Versuchsdurchführung

##### 1.5.1.3.1. Induktion

Tag 0 — behandelte Gruppe

Drei paarweise Injektionen von 0,1 ml werden jeweils rechts und links von der Mittellinie intradermal in die enthaarte Schulterregion injiziert.

Injektion 1: 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung;

Injektion 2: Prüfsubstanz in geeignetem Vehikel in der gewählten Konzentration;

Injektion 3: Prüfsubstanz in der gewählten Konzentration in einer 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung.

Bei der Injektion 3 werden die wasserlöslichen Substanzen vor der Mischung mit FCA in der wässrigen Phase gelöst. Fettlösliche oder unlösliche Substanzen werden vor der Zugabe der wässrigen Phase in FCA suspendiert. Die Endkonzentration der Prüfsubstanz entspricht der der Injektion 2.

Die Injektionen 1 und 2 werden nahe beieinander im kranialen Teil, die Injektion 3 im kaudalen Teil des Applikationsbereichs gesetzt.

Tag 0 — Kontrollgruppe

Drei paarweise Injektionen von 0,1 ml werden an denselben Stellen wie bei den behandelten Tieren injiziert.

Injektion 1: 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung;

Injektion 2: unverdünntes Vehikel;

Injektion 3: 50%ige Zubereitung (w/v) des Vehikels in einer 1:1-Mischung (v/v) aus FCA/Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung.

Tag 5-7 — behandelte und Kontrollgruppe

Etwa 24 Stunden vor der topischen Induktionsapplikation wird, wenn die Substanz nicht hautreizend ist, der kurzgeschorene oder rasierte Applikationsbereich mit 0,5 ml Natriumlaurylsulfat 10 % in Vaseline bestrichen, um eine örtliche Reizung hervorzurufen.

Tag 6-8 — behandelte Gruppe

Der Applikationsbereich wird erneut enthaart. Ein Filterpapier (2 × 4 cm) wird vollständig mit der Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel beladen, auf den Applikationsbereich aufgetragen und mit einem Okklusivverband für 48 Stunden fixiert. Die Wahl des Vehikels ist zu begründen. Feststoffe werden fein pulverisiert und in ein geeignetes Vehikel eingebracht. Flüssigkeiten können ggf. unverdünnt appliziert werden.

Tag 6-8 — Kontrollgruppe

Der Applikationsbereich wird erneut enthaart. Das Vehikel allein wird in entsprechender Weise auf den Applikationsbereich aufgebracht und mit einem Okklusivverband für 48 Stunden fixiert.

##### 1.5.1.3.2. Provokation

Tag 20-22 — behandelte und Kontrollgruppe

Die Flanken der behandelten Tiere und der Kontrolltiere werden enthaart. Ein Läppchen oder eine Kammer mit der Prüfsubstanz wird auf eine Flanke der Tiere aufgebracht, und ein Läppchen oder eine Kammer mit dem Vehikel allein kann ggf. auf die andere Flanke aufgetragen werden. Die Läppchen werden mit einem Okklusivverband für 24 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten.

#### 1.5.1.3.3. Beobachtung und Bewertung: behandelte Gruppe und Kontrollgruppe

- etwa 21 Stunden nach Entfernung des Läppchens wird der Provokationsbereich gereinigt und kurzgeschoren und/oder rasiert und bei Bedarf depiliert;
- etwa 3 Stunden später (etwa 48 Stunden nach Beginn der Provokationsexposition) wird die Hautreaktion bewertet und gemäß den im Anhang aufgeführten Schweregraden dokumentiert;
- etwa 24 Stunden nach dieser Beobachtung erfolgt eine zweite Beobachtung (72 Stunden nach Beginn), die ebenfalls dokumentiert wird.

Es empfiehlt sich eine Blindablesung der behandelten Tiere und der Kontrolltiere.

Falls eine Klärung der Ergebnisse der ersten Provokation erforderlich ist, sollte eine zweite Provokation (d. h. eine Reprovokation), ggf. mit einer neuen Kontrollgruppe, etwa eine Woche nach der ersten in Betracht gezogen werden. Eine Reprovokation kann auch mit der ursprünglichen Kontrollgruppe durchgeführt werden.

Alle Hautreaktionen und auffälligen Befunde, einschließlich systemischer Reaktionen, infolge der Induktion und der Provokation sollten beobachtet und entsprechend der Bewertungsskala nach Magnusson/Kligman (siehe Anhang) dokumentiert werden. Weitere Verfahren, wie z. B. die histopathologische Untersuchung oder die Messung der Hautfaltenstärke, können verwendet werden, um zweifelhafte Reaktionen zu klären.

#### 1.5.2. *Bübler-Test*

##### 1.5.2.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Albino-Meerschweinchen werden vor dem Test für die Dauer von mindestens 5 Tagen an die Laborbedingungen akklimatisiert. Vor Testbeginn werden die Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Behaarung wird je nach Prüfmethode durch Scheren, Rasieren oder, falls möglich, chemische Enthaarung, entfernt. Dabei ist darauf zu achten, daß die Haut nicht verletzt wird. Die Tiere werden vor Testbeginn und nach Abschluß des Tests gewogen.

##### 1.5.2.2. Versuchsbedingungen

###### 1.5.2.2.1. Versuchstiere

Es werden gängige Laborstämme des Albino-Meerschweinchens verwendet.

###### 1.5.2.2.2. Anzahl und Geschlecht

Es können männliche und/oder weibliche Tiere verwendet werden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein.

Die behandelte Gruppe besteht aus mindestens 20 Tieren, die Kontrollgruppe aus mindestens 10 Tieren.

###### 1.5.2.2.3. Dosierungen

Die für jede Induktionsexposition verwendete Konzentration der Prüfsubstanz sollte die höchstmögliche Dosis sein, die noch eine leichte aber nicht zu starke Hautreizung hervorruft. Die für die Provokationsexposition verwendete Konzentration sollte die höchste nicht reizende Dosis sein. Wenn notwendig, können die entsprechenden Konzentrationen mit einer Pilotstudie unter Verwendung von zwei bis drei Tieren ermittelt werden.

Bei wasserlöslichen Prüfsubstanzen ist es zweckmäßig, Wasser oder eine verdünnte, nicht reizende Surfactant-Lösung als Vehikel zu verwenden. Bei sonstigen Prüfsubstanzen wird 80 % Ethanol/Wasser für die Induktion und Azeton für die Provokation bevorzugt.

##### 1.5.2.3. Versuchsdurchführung

###### 1.5.2.3.1. Induktion

Tag 0 — behandelte Gruppe

Eine Flanke wird enthaart (kurzgeschoren). Das Testläppchensystem sollte vollständig mit der Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel beladen sein (die Auswahl des Vehikels muß begründet sein; flüssige Prüfsubstanzen können ggf. unverdünnt aufgetragen werden). Das Testläppchen wird auf den Applikationsbereich aufgetragen und durch ein Okklusivpflaster oder eine Okklusivkammer und einen geeigneten Verband für 6 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten.



Das Testläppchensystem muß okklusiv sein. Eine runde oder quadratische Wattekompressen ist geeignet, sollte aber mindestens 4-6 cm<sup>2</sup> groß sein. Die Fixierung der Tiere mit einem geeigneten Fixator wird jedoch zur Okklusion bevorzugt. Bei Verwendung einer Umhüllung sind unter Umständen weitere Expositionen erforderlich.

#### Tag 0 — Kontrollgruppe

Eine Flanke wird enthaart (kurzgeschoren). Das Vehikel allein wird auf die gleiche Weise wie bei der behandelten Gruppe aufgebracht. Das Testläppchensystem wird durch ein Okklusivpflaster bzw. eine Okklusivkammer und einen geeigneten Verband für 6 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten. Wenn nachweisbar ist, daß eine scheinbehandelte Kontrollgruppe nicht erforderlich ist, kann eine unbehandelte Kontrollgruppe verwendet werden.

#### Tage 6-8 und 13-15 — behandelte Gruppe und Kontrollgruppe

Dieselbe Applikation wie am Tag 0 erfolgt am Tag 6-8 sowie erneut am Tag 13-15 auf demselben Applikationsbereich (bei Bedarf enthaart) derselben Flanke.

### 1.5.2.3.2. Provokation

#### Tag 27-29 — behandelte Gruppe und Kontrollgruppe

Die unbehandelte Flanke der behandelten Tiere und der Kontrolltiere wird enthaart (kurzgeschoren). Ein Okklusivpflaster bzw. eine Okklusivkammer mit der entsprechenden Menge an Prüfsubstanz wird in der maximalen nicht hautreizenden Konzentration auf die hintere unbehandelte Flanke der behandelten Tiere und der Kontrolltiere aufgetragen.

Gegebenenfalls kann ein Okklusivpflaster bzw. eine Okklusivkammer mit dem Vehikel allein auf die vordere unbehandelte Flanke der behandelten Tiere und der Kontrolltiere aufgetragen werden. Die Lämpchen bzw. Kammern werden mit einem geeigneten Verband für 6 Stunden in Kontakt mit der Haut gehalten.

### 1.5.2.3.3. Beobachtung und Bewertung

- etwa 21 Stunden nach Entfernung des Lämpchens wird der Provokationsbereich enthaart;
- etwa 3 Stunden später (etwa 30 Stunden nach Applikation des Provokationspflasters) werden die Hautreaktionen bewertet und gemäß den im Anhang aufgeführten Schweregraden dokumentiert;
- etwa 24 Stunden nach dieser ersten Beobachtung (d. h. 54 Stunden nach Applikation des Provokationspflasters) werden die Hautreaktionen erneut bewertet und dokumentiert.

Es empfiehlt sich eine Blindablesung der behandelten Tiere und der Kontrolltiere.

Falls eine Klärung der Ergebnisse der ersten Provokation erforderlich ist, sollte eine zweite Provokation (d. h. eine Reprovokation), ggf. mit einer neuen Kontrollgruppe, etwa eine Woche nach der ersten in Betracht gezogen werden. Eine Reprovokation kann auch mit der ursprünglichen Kontrollgruppe durchgeführt werden.

Alle Hautreaktionen und auffälligen Befunde, einschließlich systemischer Reaktionen, infolge der Induktion und der Provokation sollten beobachtet und entsprechend der Bewertungsskala nach Magnusson/Kligman (siehe Anhang) dokumentiert werden. Weitere Verfahren, wie z. B. die histopathologische Untersuchung oder die Messung der Hautfaltenstärke, können verwendet werden, um zweifelhafte Reaktionen zu klären.

## 2. DATEN (GPMT UND BÜHLER-TEST)

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Aus den Daten müssen für jedes Versuchstier die Hautreaktionen zu jedem Beobachtungszeitpunkt hervorgehen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT (GPMT UND BÜHLER-TEST)**

Wenn ein Screening-Test (z. B. Lokaler Lymphknotentest [LLNA], Maus-Ohrschwellungstest [MEST]) vor dem Meerschweinchentest durchgeführt wird, muß die Beschreibung oder Literaturstelle des Tests mit Angaben zum Verfahren neben den mit den Prüf- und Referenzsubstanzen gewonnenen Ergebnissen angegeben werden.

**Prüfbericht (GPMT und Bühler-Test)**

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

*Versuchstiere:*

- verwendeter Meerschweinchenstamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Beginn der Prüfung.

*Prüfbedingungen:*

- Methode der Vorbereitung der Applikationsstelle;
- Angaben zur Art der verwendeten Läppchen sowie zur Patching-Technik;
- Ergebnis der Pilotstudie mit den für den eigentlichen Test ermittelten Induktions- und Provokationskonzentrationen;
- Angaben zur Vorbereitung, Applikation und Entfernung der Prüfsubstanz;
- Begründung der Auswahl des Vehikels;
- Konzentrationen des Vehikels und der Prüfsubstanz für die Induktions- und die Provokationsexposition sowie applizierte Gesamtmenge an Substanz zur Induktion und Provokation.

*Ergebnisse:*

- Zusammenfassung der Ergebnisse der letzten Überprüfung der Empfindlichkeit und Zuverlässigkeit des Tests (siehe 1.3) mit Angaben über verwendete Substanzen, Konzentrationen und Vehikel;
- Beobachtungen der einzelnen Tiere mit Angabe des Bewertungssystems;
- ausführliche Beschreibung der Art und des Schweregrades der beobachteten Wirkungen;
- eventuelle histopathologische Befunde.

*Diskussion der Ergebnisse.*

*Schlußfolgerungen.*

4. **LITERATUR**

Diese Methode entspricht der OECD TG 406.

---

*Anhang*

TABELLE:

**Bewertungsskala nach Magnusson/Kligman für Reaktionen auf Provokations-Läppentests**

- 0 = keine sichtbare Veränderung
  - 1 = leichtes oder fleckiges Erythem
  - 2 = mittelgradiges und konfluierendes Erythem
  - 3 = starkes Erythem und Schwellung\*
-

## B.7 TOXIZITÄT NACH 28TÄGIGER GABE (ORAL)

### 1. METHODE

#### 1.1. Einleitung

Siehe Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2. Definitionen

Siehe Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.3. Prinzip der Prüfmethode

Die Prüfsubstanz wird in abgestuften Dosen täglich mehreren Versuchstiergruppen oral verabreicht, und zwar eine Dosis pro Gruppe über einen Zeitraum von 28 Tagen. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich sorgfältig auf Toxizitätszeichen beobachtet. Tiere, die im Verlauf der Prüfung sterben, und vorzeitig getötete Tiere werden seziiert; die nach Abschluß des Tests überlebenden Tiere werden getötet und ebenfalls seziiert.

Bei dieser Methode wird das Hauptaugenmerk auf neurologische Wirkungen als spezifischem Endpunkt gelegt, und um möglichst viele Daten zu gewinnen, ist die Notwendigkeit einer sorgfältigen klinischen Beobachtung der Tiere zu unterstreichen. Die Methode sollte chemische Stoffe mit neurotoxischem Potential aufspüren, die dann gegebenenfalls eine eingehendere Untersuchung dieses Aspektes erfordern. Darüber hinaus kann die Methode Hinweise auf immunologische Wirkungen sowie toxische Wirkungen auf die Fortpflanzungsorgane liefern.

#### 1.4. Beschreibung der Prüfmethode

##### 1.4.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Tiere werden nach Zufallskriterien in Behandlungs- und der Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Käfige sollten so aufgestellt werden, daß mögliche Wirkungen aufgrund des Standortes des Käfigs ausgeschlossen sind. Die Tiere werden eindeutig gekennzeichnet und vor Beginn der Prüfung für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen in ihren Käfigen an die Laborbedingungen akklimatisiert.

Die Prüfsubstanz wird mittels Magensonde, im Futter oder mit dem Trinkwasser verabreicht. Die Art der oralen Verabreichung hängt vom Zweck der Studie sowie von den physikalischen/chemischen Eigenschaften der Substanz ab.

Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Vehikel gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst eine wäßrige Lösung/Suspension in Betracht zu ziehen, als zweite Wahl eine Lösung/Emulsion in Öl (z. B. Maisöl) und als dritte Wahl eine mögliche Lösung in anderen Vehikeln zu verwenden. Bei nichtwäßrigen Vehikeln sollten deren toxische Eigenschaften bekannt sein. Die Stabilität der Prüfsubstanz im Vehikel sollte bestimmt werden.

##### 1.4.2. Prüfbedingungen

###### 1.4.2.1. Versuchstiere

Die bevorzugte Nagerspezies ist die Ratte, aber auch andere Nagerspezies sind geeignet. Es sind gesunde junge erwachsene Tiere üblicher Labortierstämme zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Die Behandlung sollte möglichst bald nach dem Absetzen beginnen, in jedem Fall aber bevor die Tiere neun Wochen alt sind.

Bei Beginn der Studie sollte die Schwankung des Körpergewichts der behandelten Tiere gering sein und um nicht mehr als maximal  $\pm 20\%$  vom mittleren Gewicht für jedes Geschlecht abweichen.

Wenn eine orale Studie mit wiederholter Gabe als Vorstudie zu einer Langzeitstudie durchgeführt wird, sollten in beiden Studien vorzugsweise Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

###### 1.4.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) sind für jede Dosisstufe zu verwenden.

Sollen im Verlauf der Prüfung Tiere getötet werden, muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die bereits vor Abschluß der Studie getötet werden sollen.

Darüber hinaus kann eine Satellitengruppe von 10 Tieren (5 Tiere pro Geschlecht) über 28 Tage mit der höchsten Dosis behandelt und anschließend 14 Tage lang auf Reversibilität, Persistenz oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen beobachtet werden. Gleichzeitig ist eine Satellitengruppe von 10 Kontrolltieren (5 Tiere pro Geschlecht) zu verwenden.

#### 1.4.2.3. Dosierungen

Im allgemeinen sollten mindestens drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe gewählt werden. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere in der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Tiere in der Prüfgruppe. Wird bei der Verabreichung der Prüfsubstanz ein Vehikel verwendet, muß die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen erhalten.

Wenn nach Auswertung aller verfügbarer Daten bei einer Dosis von 1 000 mg/kg KG/Tag keine Wirkungen zu erwarten sind, kann ein Limit-Test durchgeführt werden. Liegen keine entsprechenden Daten vor, kann eine Dosisfindungsstudie durchgeführt werden, um die zu verwendenden Dosen zu bestimmen.

Bei der Wahl der Dosisstufen sollten sämtliche für die Prüfsubstanz oder verwandte Stoffe vorliegenden Daten zur Toxizität und (Toxiko)kinetik berücksichtigt werden. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, daß zwar toxische Wirkungen aber keine Todesfälle oder schweres Leiden hervorgerufen werden. Anschließend sollte eine absteigende Folge von Dosisstufen gewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende unerwünschte Wirkungen (NOÄL) nachzuweisen. Zwei- bis vierfache Abstände erweisen sich häufig als optimale Dosisabstufungen, und meist ist eine zusätzliche vierte Prüfgruppe der Verwendung von sehr grossen Dosisabständen (z. B. um mehr als den Faktor 10) vorzuziehen. Bei Substanzen, die über das Futter oder das Trinkwasser verabreicht werden, muß sichergestellt sein, daß die jeweiligen Mengen der Prüfsubstanz den normalen Nährstoff- und Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wird die Prüfsubstanz im Futter verabreicht, kann entweder eine konstante Konzentration im Futter (ppm) oder eine konstante Dosis in Abhängigkeit vom Körpergewicht der Tiere gewählt werden. Welche der beiden Alternativen verwendet wird, muß angegeben werden. Bei Verabreichung der Prüfsubstanz mittels Schlundsonde sollte dies täglich zur gleichen Zeit geschehen, und die Dosis sollte nach Bedarf so angepasst werden, daß eine konstante Dosis in Relation zum Körpergewicht der Tiere beibehalten wird.

Wenn eine Studie mit wiederholter Gabe als Vorstudie zu einer Langzeitstudie durchgeführt wird, sollten die beiden Studien bezüglich des Futters (Standarddiät) der Tiere vergleichbar sein.

#### 1.4.2.4. Limit-Test

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag bzw. eine entsprechende Konzentration im Futter oder Trinkwasser (in Abhängigkeit vom jeweiligen Körpergewicht) unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen, und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test findet allerdings keine Anwendung, wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung in einer höheren Dosis angezeigt erscheinen lassen.

#### 1.4.2.5. Beobachtungszeitraum

Die Tiere sollten 28 Tage beobachtet werden. Tiere in einer Satellitengruppe, bei denen Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, sollten für mindestens weitere 14 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um ein verzögertes Auftreten, die Persistenz oder die Reversibilität von toxischen Wirkungen festzustellen.

#### 1.4.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz an sieben Tagen in der Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen. Soll die Prüfsubstanz nur an fünf Tagen in der Woche verabreicht werden, muß dies begründet werden. Bei Verabreichung der Prüfsubstanz über eine Magensonde oder eine

geeignete Intubationskanüle sollte die gesamte Dosis als Einmalgabe verabreicht werden. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das bei jeder Gabe verabreicht werden kann, hängt von der Grösse des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 1 ml/100 g Körpergewicht nicht überschreiten; ausgenommen hiervon sind wäßrige Lösungen, die in einer Konzentration von 2 ml/100 g Körpergewicht gegeben werden können. Mit Ausnahme von hautreizenden oder ätzenden Substanzen, die normalerweise bei höheren Konzentrationen gravierende Wirkungen zeigen, sollte die Variabilität der Prüfvolumina durch Anpassung der Konzentration auf ein konstantes Volumen bei allen Dosen möglichst gering gehalten werden.

#### 1.4.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise jeweils zur gleichen Zeit, und unter Berücksichtigung des voraussichtlichen Zeitraums nach der Verabreichung, in welchem der Wirkungsgipfel zu erwarten ist. Der Gesundheitszustand der Tiere ist zu dokumentieren. Mindestens zweimal täglich erfolgt eine Beobachtung aller Tiere auf Erkrankungen oder Todesfälle. Moribunde Tiere sowie Tiere, bei denen schwere Leiden oder starke Schmerzen festgestellt werden, sollten ausgesondert, unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und sezirt werden.

Bei allen Tieren sollte einmal vor der Exposition (um intraindividuelle Vergleiche zu ermöglichen) und danach mindestens einmal wöchentlich eine eingehende klinische Untersuchung erfolgen. Die Beobachtungen sind ausserhalb des Käfigs, in dem die Tiere gehalten werden, in stets gleicher Umgebung und vorzugsweise stets zur gleichen Zeit vorzunehmen. Die Beobachtungen sind sorgfältig zu dokumentieren, vorzugsweise unter Verwendung von Bewertungsskalen, die vom Prüflabor genau festgelegt sind. Durch geeignete Massnahmen ist sicherzustellen, daß die Prüfbedingungen möglichst konstant bleiben und daß die Beobachtungen vorzugsweise durch Untersucher erfolgen, denen die Behandlung der Tiere nicht bekannt ist. Zu achten ist insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie autonome Aktivitäten (z. B. Tränensekretion, Pilöreaktion, Pupillengrösse, ungewöhnliche Atemmuster). Gang- und Haltungsstörungen, die Reaktion auf den Umgang mit den Tieren, sowie mögliche klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermässiges Putzverhalten, wiederholte Kreisbewegungen) oder bizarres Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten ebenfalls dokumentiert werden.

In der vierten Expositionswoche sollte die sensorische Reaktivität auf Reize verschiedener Art (z. B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize), die Greifkraft und die motorische Aktivität bewertet werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur (siehe Allgemeine Einleitung Teil B).

Die funktionellen Beobachtungen in der vierten Expositionswoche können entfallen, wenn es sich um eine Vorstudie für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische Toxizität (90 Tage) handelt. In diesem Fall sollten die funktionellen Beobachtungen im Rahmen dieser Folgestudie vorgenommen werden. Andererseits könnten die Daten über funktionelle Beobachtungen aus der Vorstudie aber die Wahl der Dosisstufen für eine nachfolgende Prüfung auf subchronische Toxizität erleichtern.

In Ausnahmefällen können funktionelle Beobachtungen auch bei Gruppen entfallen, die so starke sonstige Toxizitätszeichen aufweisen, daß die Leistungen in funktionellen Untersuchungen dadurch erheblich beeinträchtigt wären.

#### 1.4.3.2. Körpergewicht und Futter-/Wasseraufnahme

Alle Tiere sollten mindestens einmal wöchentlich gewogen werden. Die Futter- und die Wasseraufnahme (wenn die Prüfsubstanz über das Trinkwasser verabreicht wird) ist ebenfalls mindestens einmal wöchentlich zu bestimmen.

#### 1.4.3.3. Hämatologische Untersuchungen

Die folgenden hämatologischen Parameter sind am Ende der Prüfung zu bestimmen: Hämatokrit, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, weisses Gesamt- und Differentialblutbild, Thrombozytenzahl und Blutgerinnungsfähigkeit/-zeit.

Die Blutproben müssen an einer benannten Stelle unmittelbar vor oder bei der Tötung der Tiere entnommen und fachgerecht gelagert werden.

#### 1.4.3.4. Klinisch-biochemische Untersuchungen

Zur Untersuchung der wesentlichen toxischen Wirkungen in Geweben und insbesondere der Wirkungen auf Leber und Nieren sollten klinisch-biochemische Parameter in Blutproben aller Tiere bestimmt werden, die unmittelbar vor oder bei der Tötung der Tiere (mit Ausnahme von Tieren, die moribund aufgefunden und/oder zwischenzeitlich getötet werden) entnommen werden. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden (1). Die Plasma- bzw. Serumuntersuchungen umfassen die Parameter Natrium, Kalium, Glukose, Gesamtcholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Gesamtprotein und Albumin sowie mindestens zwei Enzyme, die auf hepatozelluläre Wirkungen schließen lassen (wie Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, alkalische Phosphatase, Gammaglutamyl-Transpeptidase und Sorbitdehydrogenase). Die Bestimmung weiterer Enzyme (aus Leber oder anderen Organen) und der Gallensäuren kann unter bestimmten Umständen ebenfalls wertvolle Hinweise liefern.

(1) Bei einer Reihe von Bestimmungen im Serum und Plasma, insbesondere der Glukose, ist eine Futterkarenz über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, daß die erhöhte Variabilität, die sich notwendigerweise bei fehlender Futterkarenz zeigen würde, weniger ausgeprägte Wirkungen verdecken und damit die Interpretation erschweren könnte. Andererseits jedoch kann die nächtliche Nahrungskadenz den allgemeinen Stoffwechsel der Tiere beeinflussen und, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegenüber der Prüfsubstanz beeinträchtigen. Wenn man sich für die nächtliche Futterkarenz entscheidet, sollten die klinisch-biochemischen Parameter nach Durchführung der funktionellen Beobachtungen in Woche 4 der Studie bestimmt werden.

Wahlweise können in der letzten Studienwoche auch die folgenden Urinparameter bestimmt werden: Aussehen, Menge, Osmolarität bzw. spezifisches Gewicht, pH, Eiweiß, Glukose und Blut/Blutzellen.

Darüber hinaus kommen Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebeschädigung in Frage. Des weiteren sollten, wenn die bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz im Verdacht stehen, die entsprechenden Stoffwechselprofile zu beeinflussen, die Parameter Kalzium, Phosphat, Nüchtern-Triglyzeride, spezifische Hormone, Methämoglobin und Cholinesterase bestimmt werden. Die jeweiligen Parameter sind je nach Prüfsubstanzklasse bzw. von Fall zu Fall zu bestimmen.

Insgesamt jedoch ist, je nach Versuchstierspezies und den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen.

Wenn die vorliegenden Ausgangsdaten unzureichend sind, sollten hämatologische und klinisch-biochemische Parameter ggf. auch vor der Verabreichung der Prüfsubstanz bestimmt werden.

#### 1.4.3.5. Autopsie

Alle Versuchstiere werden einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen. Sie umfasst eine sorgfältige Untersuchung der äusseren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Hirn-, Brust- und Bauchhöhle und ihres Inhalts. Leber, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nebenhoden, Thymus, Milz, Hirn und Herz aller Tiere sind von anhaftendem Gewebe zu befreien und möglichst bald nach der Sektion zu wiegen, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die folgenden Gewebe sind in einem für das Gewebe und die später vorgesehene histopathologische Untersuchung geeigneten Medium aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Hirn (typische Regionen einschließlich Cerebrum, Cerebellum und Pons), Rückenmark, Magen, Dünn- und Dickdarm (mit Peyer'schen-Platten), Leber, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Thymus, Schilddrüsen, Trachea und Lungen (konserviert durch Inflation mit Fixiermittel und Immersion), Gonaden, akzessorische Geschlechtsorgane (Uterus, Prostata), Harnblase, Lymphknoten (vorzugsweise ein Lymphknoten, der den Verabreichungsweg versorgt, und ein Lymphknoten distal vom Verabreichungsweg für

systemische Wirkungen), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis) vorzugsweise in der Nähe des Muskels, sowie ein Knochenmarkschnitt (oder wahlweise ein frisch fixiertes Knochenmarkspirat). Je nach den klinischen oder sonstigen Befunden kann die Untersuchung weiterer Gewebe notwendig sein. Schließlich sollten auch alle Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als wahrscheinliche Zielorgane in Frage kommen, aufbewahrt werden.

#### 1.4.3.6. Histopathologische Untersuchung

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosis sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine umfassende histologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere aller anderen Dosisgruppen auszuweiten, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden.

Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen.

Umfasst die Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den behandelten Gruppen toxische Wirkungen erkennbar sind.

## 2. DATEN

Die Daten für die einzelnen Tiere sollten dokumentiert werden. Ferner sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der verwendeten Tiere bei Beginn der Prüfung, die Anzahl der Tiere, die während der Prüfung tot aufgefunden oder vorzeitig getötet wurden, der Todeszeitpunkt der einzelnen Tiere, die Anzahl der Tiere mit Toxizitätszeichen, eine Beschreibung der beobachteten toxischen Wirkungen einschließlich Beginn, Dauer und Schweregrad der Wirkungen, die Anzahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und für jede Läsion der Anteil der davon betroffenen Tiere.

Die Rohdaten sind nach Möglichkeit durch geeignete und allgemein akzeptierte statistische Verfahren auszuwerten. Diese statistischen Verfahren sollten bei der Festlegung des Designs der Studie ausgewählt werden.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### Prüfbericht

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, in den folgenden Wochen und am Ende der Prüfung.

Prüfbedingungen:

- Begründung der Auswahl des Vehikels, falls kein Wasser verwendet wurde;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitungsform der Prüfsubstanz, der erreichten Konzentration, Stabilität und Homogenität des Präparates;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität.

Ergebnisse:

- Körpergewicht/Änderungen des Körpergewichts;
- ggf. Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme;
- Daten der toxischen Reaktionen nach Geschlecht und Dosis, einschließlich Toxizitätszeichen;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);



- Bewertung von sensorischer Aktivität, Greifkraft und motorischer Aktivität;
- hämatologische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;
- klinisch-biochemische Parameter mit entsprechenden Ausgangswerten;
- Körpergewicht beim Töten der Tiere sowie Organgewichte;
- Sektionsbefunde;
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- Angaben zur Resorption, falls vorliegend;
- ggf. statistische Auswertung der Ergebnisse.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATUR

Diese Methode entspricht der ÖCD TG 407

## B.8. TOXIZITÄT NACH 28-TÄGIGER GABE (INHALATION)

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Es ist vorteilhaft, vorher Angaben zur Partikelgrößenverteilung, zum Dampfdruck, Schmelzpunkt, Siedepunkt, Flammpunkt und zur Explosivität (falls zutreffend) der Substanz zu haben.

Siehe auch allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt A).

#### 1.2. DEFINITION

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt B).

#### 1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Mehrere Versuchstiergruppen werden täglich über einen bestimmten Zeitraum der Prüfsubstanz in abgestuften Konzentrationen für 28 Tage ausgesetzt, wobei eine Konzentration für jede Gruppe verwendet wird. Wird ein Vehikel herangezogen, um eine geeignete Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen, ist eine Vehikel-Kontrollgruppe einzusetzen. Während des Versuchszeitraums werden die Tiere täglich beobachtet, um Symptome toxischer Wirkungen festzustellen. Tiere, die während des Versuchs sterben, und die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden sezirt.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

##### 1.6.1. Vorbereitung

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- oder Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor dem Versuch werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Zahl von Gruppen zugeordnet. Falls notwendig kann der Prüfsubstanz ein geeignetes Vehikel beigegeben werden, um die gewünschte Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen. Wird zur Vereinfachung der Verabreichung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz verwendet, muß dessen nichttoxische Wirkung gesichert sein. Dazu können ggf. Daten aus früheren Versuchen herangezogen werden.

##### 1.6.2. Versuchsbedingungen

###### 1.6.2.1. Versuchstiere

Sofern nicht besondere Gründe vorliegen, sollten die Versuche mit Ratten durchgeführt werden. Es sind gesunde junge Tiere bekannter Versuchstierstämme zu verwenden.

Die Schwankung im Körpergewicht der Tiere des jeweiligen Versuchs sollte zu Beginn des Versuchs nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom entsprechenden Mittelwert betragen.

###### 1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) sind für jede Testkonzentration zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an

Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 10 Tieren (5 Tiere pro Geschlecht) über 28 Tage mit der höchsten Konzentration exponiert werden. Während der darauffolgenden behandlungsfreien 14 Tage wird auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen geachtet. Eine Satellitengruppe von 10 Kontrolltieren (5 Tiere pro Geschlecht) wird ebenfalls verwendet.

#### 1.6.2.3. Expositionskonzentrationen

Es sind mindestens drei Konzentrationen sowie eine Kontrollgruppe oder - sofern ein Vehikel benutzt wurde - eine Vehikel-Kontrollgruppe (entsprechend der Konzentration des Vehikels bei der höchsten Expositionskonzentration) zu wählen. Abgesehen von der Exposition mit der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Die höchste Konzentration sollte so gewählt werden, daß auf jeden Fall toxische Effekte auftreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so sollte die niedrigste Konzentration diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Konzentration nur geringe feststellbare toxische Effekte verursachen. Werden mehrere Zwischenkonzentrationen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß es zu einer graduellen Abstufung der toxischen Wirkungen kommt. In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Konzentration sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl der Todesfälle gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

#### 1.6.2.4. Expositionszeit

Die tägliche Expositionszeit sollte 6 Stunden betragen; aufgrund spezifischer Erfordernisse können sich ggf. andere Zeiten als notwendig erweisen.

#### 1.6.2.5. Ausrüstung

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die einen dynamischen Luftstrom mit einem Luftwechsel von mindestens 12 mal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßig verteilte Expositionsatmosphäre zu gewährleisten. Wird eine Kammer verwendet, so ist sie so zu gestalten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden und die Exposition durch Inhalation der Prüfsubstanz maximiert wird. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das "Gesamtvolumen" der Versuchstiere 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten. Es sind Expositionen des oronasalen Bereichs, des Kopfes oder des ganzen Körpers in Inhalationskammern zu verwenden; die beiden ersten Expositionsarten dienen dazu, die Aufnahme der Prüfsubstanz auf anderen Wegen einzuschränken.

#### 1.6.2.6. Beobachtungszeitraum

Die Versuchstiere sind während des gesamten Behandlungszeitraumes und der behandlungsfreien Phase täglich auf Symptome toxischer Wirkungen zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Symptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

#### 1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere werden der Prüfsubstanz täglich an 5-7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen ausgesetzt. Die Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 14 Tage ohne Exposition gehalten werden, um die Reversibilität von toxischen Effekten bzw. deren Fortbestehen festzustellen. Die Temperatur soll während des Versuchs  $22\text{ C} \pm 3\text{ C}$  betragen.

Die relative Feuchtigkeit soll zwischen 30 % und 70 % liegen, ausgenommen in den Fällen, wo dies nicht durchführbar ist (z. B. Versuche mit bestimmten Aerosolen). Die Aufrechterhaltung eines leichten Unterdrucks in der Kammer ( $\leq 5$  mm Wasser) verhindert ein Entweichen der Prüfsubstanz in die Umgebung. Während der Exposition werden weder Futter noch Wasser verabreicht.

Es soll ein dynamisches Inhalationssystem mit einem geeigneten analytischen Verfahren zur Bestimmung der Konzentration benutzt werden. Um brauchbare Expositionskonzentrationen zu erhalten, wird ein Vorversuch empfohlen. Die Luftdurchflußrate ist so einzustellen, daß die Bedingungen in der gesamten Expositionskammer einheitlich sind. Das System soll gewährleisten, daß konstante Expositionsbedingungen so schnell wie möglich erreicht werden. Die folgenden Messungen oder Überwachungen sollten durchgeführt werden:

a) Messung der Luftdurchflußrate (kontinuierlich)

b) Die tatsächliche Konzentration der Prüfsubstanz wird im Atembereich gemessen. Während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht mehr als  $\pm 15$  % vom Mittelwert abweichen. Bei einigen Aerosolen ist dieses Prüfniveau möglicherweise nicht erreichbar. In diesem Fall wird ein größerer Streubereich akzeptiert. Während der gesamten Versuchsdauer ist die Konzentration von Tag zu Tag so konstant wie möglich zu halten. Für Aerosole ist mindestens einmal pro Woche eine Analyse der Partikelgröße für jede Versuchsgruppe durchzuführen.

c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit (wenn möglich kontinuierlich).

Während und nach der Exposition werden die Tiere beobachtet und die Befunde für jedes Tier aufgezeichnet. Alle Tiere sollen täglich beobachtet und Zeichen toxischer Wirkungen aufgezeichnet werden, darunter der Zeitpunkt des Auftretens sowie Grad und Dauer. Die Beobachtungen der Tiere sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten, Atmung, Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie an der Somatomotorik und am Verhaltensmuster erstrecken. Futteraufnahme und Gewicht der Tiere sind wöchentlich zu bestimmen. Eine regelmässige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß Tiere während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe oder Fehler beim Umsetzen verloren gehen. Nach Abschluß des Versuchszeitraumes werden alle überlebenden Tiere mit Ausnahme der Satellitengruppe seziert. Sterbende Tiere sowie Tiere, bei denen Anzeichen von starkem Leiden und Schmerzen festgestellt werden, sollten daraufhin sofort ausgesondert und unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und seziert werden.

Am Ende des Versuchs werden alle Tiere, einschließlich der Kontrolltiere, folgenden Untersuchungen unterzogen:

(i) Die Hämatologie sollte mindestens die Bestimmung des Hämatokritwertes und der Hämoglobinkonzentration, der Erythrozytenzahl, der Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl sowie die Messung der Gerinnungsfähigkeit umfassen.

(ii) Klinisch-biochemische Analyse des Blutes: Zur Beurteilung der Leber- und Nierenfunktion sollte zumindest je einer der folgenden Parameter bestimmt werden: Alanin-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Pyruvat-Transaminase), Aspartat-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), Harnstoff-Stickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Serum-Protein.

Bestimmungen weiterer blutchemischer Parameter, die ggf. für eine adäquate toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern glukose, Lipide, Hormone, Säuren-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität.

Zusätzliche klinisch-biochemische Analysen können ggf. notwendig sein, um die Untersuchung der beobachteten Effekte zu vertiefen.

#### 1.6.3.1. Autopsie

An allen am Versuch beteiligten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen.

Zumindest die Leber, die Nieren, die Nebennieren, die Lunge und die Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Organe und Gewebe (Atemtrakt, Leber, Niere, Milz, Hoden, Nebennieren, Herz sowie alle Organe mit makroskopischen Veränderungen bzw. Grössenveränderungen) sind im Hinblick auf spätere histopathologische Untersuchungen in einem geeigneten Medium aufzubewahren. Die Lungen sind in intaktem Zustand zu entfernen, zu wiegen und mit einem geeigneten Fixativ zu behandeln, um die Lungenstruktur zu erhalten.

#### 1.6.3.2. Histopathologische Untersuchung

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe(n) ist eine histologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Alle Organe und Gewebe, die in der Gruppe mit der höchsten Dosierung prüfsubstanzbedingte Schädigungen aufweisen, müssen auch bei allen anderen Gruppen bei geringerer Dosierung untersucht werden. Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe mit besonderer Aufmerksamkeit zu untersuchen, bei denen in den anderen behandelten Gruppen toxische Effekte auftraten.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Dosisgruppe und Kontrollgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs und die Anzahl der Tiere mit den einzelnen Schädigungsformen zu entnehmen sein.

Alle ermittelten Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Dazu kann jede anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Versuchsbedingungen;

Beschreibung des Expositionsapparates einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Aerosolzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und ggf. Art der Unterbringung der Tiere in einer Versuchskammer. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und ggf. der Konstanz der Aerosolkonzentration oder Teilchengrößenverteilung sind zu beschreiben.

Expositionsdaten:

Diese Daten sind in tabellarischer Form zusammenzustellen und unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankungen (z. B. Standardabweichung) darzustellen. Sie sollen, wenn möglich, folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
  - b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
  - c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wurde, dividiert durch das Luftvolumen);
  - d) ggf. die Art des Vehikels;
  - e) tatsächliche Konzentrationen im Atembereich;
  - f) der mittlere ärodynamische Massendurchmesser (Maß Median Ärodynamischer Durchmesser - MMAD) und die geometrische Standardabweichung (Geometric Standard Deviation - GSD);
- Daten über toxische Reaktionen, nach Geschlecht und Konzentration;
  - Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
  - toxische bzw. andere Wirkungen; no-effect level (NEL);
  - Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Zeichen einer toxischen Wirkung und deren weiterer

Verlauf;

- Angaben über Fütterung und Körpergewicht;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-biochemische Tests und deren Ergebnisse;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung der histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt D).

### 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt E).

## B.9. TOXIZITÄT NACH 28-TÄGIGER GABE (DERMAL)

### 1. METHODE

#### 1.1. EINLEITUNG

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt A).

#### 1.2. DEFINITIONEN

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt B).

#### 1.3. BEZUGSSUBSTANZEN

Keine.

#### 1.4. PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird täglich in abgestuften Dosen mehreren Versuchstiergruppen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 28 Tagen. Während des Versuchszeitraums werden die Tiere täglich beobachtet, um Symptome toxischer Wirkungen festzustellen. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie bei Versuchsende überlebende Tiere werden seziiert.

#### 1.5. QUALITÄTSKRITERIEN

Keine.

#### 1.6. BESCHREIBUNG DER METHODE

##### 1.6.1. Vorbereitung

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- oder Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor dem Versuch werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeordnet. Kurz vor Versuchsbeginn wird das Fell auf dem Rücken der Versuchstiere geschoren. Ein Abrasieren des Fells ist ebenfalls möglich, sollte jedoch 24 Stunden vor dem Versuch erfolgen. Das Scheren oder Rasieren muß normalerweise wöchentlich wiederholt werden. Es ist darauf zu achten, daß dabei die Haut nicht verletzt wird. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation vorbereitet. Bei der Bestimmung des zu scherenen Bereichs und der Applikationsfläche ist das Gewicht der Tiere zu berücksichtigen. Werden feste Stoffe verwendet, die gegebenenfalls pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder ggf. in anderer geeigneter Form angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut sicherzustellen. Flüssige Prüfsubstanzen werden im allgemeinen unverdünnt angewendet. Die Applikation erfolgt täglich an 5 bis 7 Tagen pro Woche.

##### 1.6.2. Versuchsbedingungen

###### 1.6.2.1. Versuchstiere

Es können geschlechtsreife Ratten oder Kaninchen verwendet werden. Auch andere Tierarten können verwendet werden, jedoch muß ihre Verwendung begründet werden.

Die Schwankung des Körpergewichts der Tiere des jeweiligen Versuchs sollte bei Versuchsbeginn nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom entsprechenden Mittelwert betragen.

###### 1.6.2.2. Anzahl und Geschlecht

Mindestens 10 Tiere (5 weibliche und 5 männliche) mit gesunder unbeschädigter Haut sind für jede Dosierung zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig

sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 10 Tieren (5 Tiere pro Geschlecht) über 28 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden. Während der darauffolgenden behandlungsfreien 14 Tage wird auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen geachtet. Eine Satellitengruppe von 10 Kontrolltieren (5 Tiere pro Geschlecht) wird ebenfalls verwendet.

#### 1.6.2.3. Dosierungen

Es sind mindestens drei Dosierungen sowie eine Kontrollgruppe oder - sofern ein Vehikel benutzt wurde - eine Vehikel-Kontrollgruppe zu wählen. Die Einwirkungszeit sollte mindestens 6 Stunden pro Tag betragen. Die Applikation der Prüfsubstanz sollte täglich zur gleichen Zeit erfolgen. Eine Anpassung der Dosierung an das Körpergewicht ist in festgesetzten Intervallen (wöchentlich oder zweimal wöchentlich) vorzunehmen, um in Relation zum Körpergewicht des Tieres ein konstantes Dosierungsniveau zu erhalten. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Wird zur Erleichterung der Applikation ein Vehikel benutzt, so wird der Kontrollgruppe das Vehikel in gleicher Weise verabreicht wie den behandelten Tieren, und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung sollte so gewählt werden, daß auf jeden Fall toxische Effekte auftreten, die

Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung sollte keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so sollte die niedrigste Dosis diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Effekte verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß es zu einer graduellen Abstufung der toxischen Wirkungen kommt. In den Gruppen mit niedriger oder mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl der Todesfälle gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Führt die Applikation der Prüfsubstanz zu schweren Hautreizungen, sollte die Konzentration herabgesetzt werden, was bei hoher Dosierung zu einer Verminderung oder einem Ausbleiben sonstiger toxischer Wirkungen führen könnte. Wurde überdies die Haut stark beschädigt, ist es u. U. notwendig, den Versuch abzubrechen und mit einer geringeren Konzentration erneut durchzuführen.

#### 1.6.2.4. Limit-Test

Verursacht bei Durchführung einer Vorstudie die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg bzw. einer höheren Dosis, die einer möglichen Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Auswirkungen, so ist eine weitere Prüfung nicht erforderlich.

#### 1.6.2.5. Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Symptome toxischer Wirkungen zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Symptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

#### 1.6.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere sollten einzeln in Käfigen gehalten werden. Sie erhalten die Prüfsubstanz vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 28 Tagen. Die Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 14 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität bzw. Fortbestehen toxischer Wirkungen zu beobachten. Die Expositionszeit beträgt mindestens 6 Stunden pro Tag.

Die Prüfsubstanz ist einheitlich auf einen Bereich, der etwa 10 % der Körperoberfläche



entspricht, aufzutragen. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein, es sollte jedoch ein möglichst grosser Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht exponiert werden.

Die Prüfsubstanz ist während der Expositionszeit mit einem porösen Mullverband und einem hautschonenden Pflaster in Kontakt mit der Haut zu halten. Die Versuchsfläche ist ausserdem auf eine geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, daß die Tiere die Prüfsubstanz nicht oral aufnehmen können. Es können auch Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden, eine vollständige Immobilisierung ist jedoch nicht zu empfehlen. Als Alternative kann eine "Halsmanschette" verwendet werden.

Nach Ablauf der Expositionszeit entfernt man - soweit möglich - den Rest der Prüfsubstanz, und zwar unter Verwendung von Wasser oder eines anderen geeigneten Hautreinigungsverfahrens. Alle Tiere sollen täglich beobachtet und Zeichen toxischer Wirkungen, darunter der Zeitpunkt des Auftretens sowie Grad und Dauer aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten, Atmung, Kreislauf, autonomem und zentralem Nervensystem sowie an der Somatomotorik und am Verhaltensmuster erstrecken. Die Futterraufnahme und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt. Eine regelmässige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß Tiere während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe oder Fehler beim Umsetzen verloren gehen. Nach Abschluß des Versuchszeitraumes werden alle überlebenden Tiere mit Ausnahme der Satellitengruppe seziiert. Sterbende Tiere sowie Tiere, bei denen Anzeichen von starkem Leiden und Schmerzen festgestellt werden, sollten daraufhin sofort ausgesondert und unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und seziiert werden.

Am Ende des Versuchs werden alle Tiere, einschließlich der Kontrolltiere, folgenden Untersuchungen unterzogen:

1) Die Hämatologie sollte mindestens die Bestimmung des Hämatokritwertes und Hämoglobinkonzentration, der Erythrozytenzahl, der Gesamt- und Differential-Leukozytenzahl sowie die Messung der Gerinnungsfähigkeit umfassen.

2) Klinisch-biochemische Analyse des Blutes: Zur Beurteilung der Leber- und Nierenfunktion sollte zumindest je einer der folgenden Parameter bestimmt werden: Alanin-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase), Aspartat-Aminotransferase (früher bekannt als Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), Harnstoff-Stickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und Gesamt-Serum-Protein.

Bestimmungen weiterer blutchemischer Parameter, die ggf. für eine adäquate toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchternblutglukose, Lipide, Hormone, Säuren-Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität.

Zusätzliche klinisch-biochemische Analysen können ggf. notwendig sein, um die Untersuchung der beobachteten Effekte zu vertiefen.

#### 1.6.4. Autopsie

An allen am Versuch beteiligten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Zumindest die Leber, die Nieren, die Nebennieren und die Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Organe und Gewebe, d. h. unbehandelte und behandelte Haut, Leber, Nieren, Milz, Hoden, Nebennieren, Herz und Zielorgane (Organe mit makroskopischen Veränderungen bzw. Grössenveränderungen) sind in einem geeigneten Medium für mögliche spätere histopathologische Untersuchungen aufzubewahren.

#### 1.6.5. Histopathologische Untersuchungen

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine histologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Alle Organe und Gewebe, die in der Gruppe mit der höchsten Dosierung prüfsubstanzbefindliche Schädigungen aufweisen, müssen auch bei allen anderen Gruppen bei geringerer Dosierung untersucht werden. Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe mit besonderer Aufmerksamkeit zu untersuchen, bei denen in den anderen behandelten Gruppen Vergiftungssymptome auftraten.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Dosisgruppe und Kontrollgruppe die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs und die Anzahl der Tiere mit den einzelnen Schädigungsformen zu entnehmen sein.

Alle ermittelten Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Dazu kann jede anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. PRÜFBERICHT

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Angaben zu den Tieren (Tierart, Stamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.);
- Versuchsbedingungen (einschließlich Art des Verbandes: okklusiv oder nicht-okklusiv);
- Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;
- N effect-level (NEL), falls möglich;
- Daten über toxische Reaktionen, nach Geschlecht und Konzentration;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- toxische und andere Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Zeichen toxischer Wirkungen und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Fütterung und Körpergewicht;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-biochemische Tests und deren Ergebnisse;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung der histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. BEWERTUNG UND INTERPRETATION

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt D).

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung - Teil B (Punkt E).

## B.10. MUTAGENITÄT – *IN VITRO*-TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERZELLEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 473, *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

#### 1.1 EINLEITUNG

Der *In-Vitro*-Test auf Chromosomenaberrationen dient zum Nachweis von Agenzien, die in Säugerzellkulturen strukturelle Chromosomenaberrationen auslösen. (1)(2)(3). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Eine Zunahme der Polyploidie ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß ein chemischer Stoff numerische Aberrationen hervorzurufen vermag. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Aberrationen bestimmt und wird daher auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, daß Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge, die Änderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen somatischer Zellen auslösen, an der Entstehung von Krebs bei Menschen und Versuchstieren beteiligt sind.

Beim *In-vitro*-Chromosomenaberrationstest können Kulturen von etablierten Zelllinien und Zellstämmen oder primäre Zellkulturen zum Einsatz kommen. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt der Wachstumsfähigkeit in Kultur, der Karyotypstabilität, der Chromosomenzahl, der Chromosomenvielfalt und der spontanen Häufigkeit von Chromosomenaberrationen ausgewählt.

*In vitro* durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem System lassen sich aber die *In-vivo*-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, bei denen positive Ergebnisse auftreten, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (4)(5).

Dieser Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Kanzerogene in Säugetierzellen. Viele chemische Verbindungen, bei denen der Test positiv ausfällt, haben eine kanzerogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation zwischen Test und Kanzerogenität. Die Korrelation ist von der chemischen Klasse abhängig, und es gibt zunehmende Anzeichen dafür, daß bestimmte Kanzerogene durch diesen Test nicht nachweisbar sind, da ihre Wirkung anscheinend auf anderen Mechanismen als einer direkten DNA-Schädigung beruht.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2 DEFINITIONEN

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

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

**Endoreduplikation:** Prozeß, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4, 8, 16, ... Chromatiden.

**Gap:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatide(n).

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

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Zellen charakteristisch ist.

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

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

### 1.3 PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Behandlung der Zellkulturen mit der Prüfsubstanz erfolgt mit und ohne Zusatz eines Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Nach Ablauf eines vorher festgelegten Zeitraums werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift (z.B. Colcemid® oder Colchicin) behandelt, gewonnen und gefärbt, woraufhin die Metaphasezellen mikroskopisch auf Chromosomenaberrationen untersucht werden.

### 1.4 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1 Vorbereitungen

##### 1.4.1.1 Zellen

Es können verschiedene Zelllinien, Zellstämme oder primäre Zellkulturen, auch menschliche Zellen, Verwendung finden (z.B. Fibroblasten des chinesischen Hamsters, Lymphozyten aus dem peripheren Blut von Menschen oder anderen Säugern).

##### 1.4.1.2 Kulturmedien und Inkubationsbedingungen

Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Etablierte Zelllinien und -stämme sind routinemäßig auf Stabilität der modalen Chromosomenzahl und Mycoplasmaverunreinigung zu überprüfen und sollten bei Verunreinigung nicht herangezogen werden. Die normale Dauer des Zellzyklus bei den gewählten Zellen und Inkubationsbedingungen sollte bekannt sein.

#### 1.4.1.3 *Vorbereitung der Kulturen*

Etablierte Zelllinien und -stämme: die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen, im Kulturmedium in einer solchen Dichte überimpft, daß die Kultur vor dem Zeitpunkt der Gewinnung nicht konfluent wird, und bei 37°C inkubiert.

Lymphozyten: mit einem Antikoagulans (z.B. Heparin) behandeltes Vollblut oder separierte Lymphozyten von gesunden Probanden werden dem Kulturmedium beigegeben, das ein Mitogen (z.B. Phytohämagglutinin) enthält, und bei 37°C inkubiert.

#### 1.4.1.4 *Stoffwechselaktivierung*

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Fremdstoff-Metabolisierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9) oder einem Gemisch aus Phenobarbiton und  $\beta$ -Naphthoflavon (10)(11)(12) vorbehandelt wurde.

Die post-mitochondriale Fraktion wird im Endmedium in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10 % v/v verwendet. Der Zustand des Stoffwechselsystems ist möglicherweise von der geprüften chemischen Klasse abhängig. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der post-mitochondrialen Fraktion zu verwenden.

Eine Reihe von Entwicklungen, darunter die Herstellung gentechnisch veränderter Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme, eröffnen vielleicht die Möglichkeit für eine endogene Aktivierung. Die Wahl der verwendeten Zelllinien sollte wissenschaftlich begründet sein (z.B. durch die Relevanz des Isoenzym Cytochrom P450 für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz).

#### 1.4.1.5 *Prüfsubstanz/Zubereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen..

### 1.4.2 **Prüfbedingungen**

#### 1.4.2.1 *Lösungsmittel/Vehikel*

Die Lösungsmittel/Vehikel sollten nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und sie sollten mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein. Das Wasser läßt sich durch Zusatz eines Molekularsiebs entfernen.

#### 1.4.2.2 *Expositionskonzentration*

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität, die Löslichkeit im Versuchssystem und die Veränderungen des pH-Wertes oder der Osmolalität.

Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne Stoffwechselaktivierung unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zellintegrität und -wachstum wie Konfluenzgrad, Anzahl der lebensfähigen Zellen oder Mitoseindex bestimmt werden. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Löslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen.

Es sind mindestens drei analysierbare Konzentrationen zu verwenden. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten diese Konzentrationen den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Im Normalfall bedeutet dies, daß sich die Konzentrationen maximal um einen Faktor zwischen 2 und  $\sqrt{10}$  unterscheiden. Zum Zeitpunkt der Gewinnung sollte die höchste Konzentration eine deutliche Verminderung des Konfluenzgrades, der Anzahl der Zellen oder des Mitoseindex (jeweils um mehr als 50 %) erkennen lassen. Der Mitoseindex ist nur ein indirekter Gradmesser für zytotoxische/zytostatische Wirkungen und hängt davon ab, wieviel Zeit seit der Behandlung vergangen ist. Allerdings ist der Mitoseindex für Suspensionskulturen vertretbar, bei denen andere Methoden zur Toxizitätsbestimmung möglicherweise umständlich oder unpraktisch sind. Informationen über die Zellzykluskinetik, z.B. die mittlere Generationszeit (MGZ), könnten als zusätzliche Angaben herangezogen werden. Bei der MGZ handelt es sich jedoch um einen Gesamtdurchschnittswert, der nicht immer das verspätete Auftreten von Teilpopulationen erkennen läßt, und schon ein leichter Anstieg der mittleren Generationszeit kann eine erhebliche Verzögerung des Zeitpunkts der optimalen Ausbeute an Aberrationen zur Folge haben.

Bei relativ nichtzytotoxischen Substanzen sollte die Höchstkonzentration bei Versuchen 5 µl/ml, 5 mg/ml oder 0.01 M betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist.

Im Falle relativ unlöslicher Substanzen, die bei Konzentrationen unterhalb der unlöslichen Konzentration nicht toxisch sind, sollte die höchste verwendete Dosis eine Konzentration oberhalb der Löslichkeitsgrenze im Endmedium nach Ablauf der Behandlungszeit sein. In bestimmten Fällen (z.B. wenn die Toxizität nur bei einer Konzentration auftritt, die über der geringsten unlöslichen Konzentration liegt) ist es ratsam, die Prüfung bei mehr als einer Konzentration mit sichtbarer Ausfällung vorzunehmen. Möglicherweise ist es sinnvoll, die Löslichkeit zum Anfang und Abschluß der Behandlung zu bestimmen, da sich die Löslichkeit im Versuchssystem während der Exposition aufgrund des Vorhandenseins von Zellen, S9, Serum usw. verändern kann. Die Unlöslichkeit ist mit dem bloßen Auge erkennbar. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

#### 1.4.2.3 *Negativ- und Positivkontrollen*

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Bei Stoffwechselaktivierung sollte die Positivkontrollsubstanz jene Substanz sein, die zur mutagenen Reaktion eine Aktivierung benötigt.

Zur Positivkontrolle sollte ein bekanntes Clastogen in Expositionskonzentrationen verwendet werden, die voraussichtlich eine reproduzierbare und erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben, womit sich die Empfindlichkeit des Versuchssystems demonstrieren läßt.

Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Stoffwechselaktivierungsstatus	Substanz	CAS-Nummer.	EINECS-Nummer.
ohne exogene Stoffwechselaktivierung	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
	Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitroquinolin-N-oxid	56-57-5	200-281-1
mit exogener Stoffwechselaktivierung	Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
	Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
	Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	

Es können auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen verwendet werden. Gegebenenfalls sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören, wie der Prüfstoff.

Bei jedem Gewinnungszeitpunkt sind Negativkontrollen hinzuzuziehen, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel oder Vehikel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

### 1.4.3 Verfahren

#### 1.4.3.1 *Behandlung mit der Prüfsubstanz*

Proliferierende Zellen werden mit und ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Behandlung der Lymphozyten sollte ca. 48 Stunden nach der mitogenen Stimulierung beginnen.

#### 1.4.3.2

Im Normalfall sollten für jede Konzentration zwei parallele Kulturen verwendet werden, die auch nachdrücklich für Negativ-(Lösungsmittel-)Kontrollkulturen empfohlen werden. Läßt sich anhand von historischen Daten nachweisen, daß zwischen den Zweifachkulturen nur eine minimale Abweichung besteht (13)(14), so ist ggf. die Verwendung von Einfachkulturen für jede Konzentration vertretbar.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z.B. in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (15)(16).

#### 1.4.3.3 *Zeitpunkt der Gewinnung der Kulturen*

Beim ersten Versuch sollten die Zellen 3 bis 6 Stunden lang mit und ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt werden, wobei eine Aufarbeitung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus nach Behandlungsbeginn entspricht (12). Ergibt dieses Protokoll sowohl mit als auch ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems negative Ergebnisse, so sollte ein weiterer Versuch ohne Aktivierung vorgenommen werden, bei dem eine kontinuierliche Behandlung bis hin zur Probenahme nach Ablauf eines Zeitraums erfolgt, der etwa der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht. Bestimmte Stoffe sind möglicherweise leichter nachweisbar, wenn der Zeitraum für die Behandlung/Probenahme mehr als die 1,5fache Dauer des normalen Zellzyklus beträgt. Negative Befunde bei Zusatz eines Metabolisierungssystems bedürfen der Bestätigung durch Einzelfallprüfung. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Befunde nicht für erforderlich gehalten wird, ist eine Begründung anzugeben.

#### 1.4.3.4 *Chromosomenpräparation*

Die Zellkulturen werden vor der Gewinnung in der Regel ein bis drei Stunden lang mit Colcemid<sup>®</sup> oder Colchicin behandelt. Für die Chromosomenpräparation wird jede Zellkultur gesondert gewonnen und aufgearbeitet. Zur Chromosomenpräparation gehören die Behandlung der Zellen mit hypotoner Lösung, die Fixierung und Färbung.

#### 1.4.3.5 *Analyse*

Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die bei allen Zelltypen dem Modalwert  $\pm 2$  entspricht. Es sind mindestens 200 gut gespreitete Metaphasen je Konzentration und Kontrolle zu analysieren und bei Zweifachkulturen gleichmäßig auf diese zu verteilen. Eine Reduzierung dieser Zahl ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird.

Obwohl es bei der Prüfung um den Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen geht, ist das Auftreten von Polyploidie und Endoreduplikation unbedingt zu vermerken.

## 2. **DATEN**

### 2.1 **AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE**

Versuchseinheit ist die Zelle, und daher ist der Anteil der Zellen mit struktureller Chromosomenaberration bzw. strukturellen Chromosomenaberrationen zu bewerten. Für die Versuchs- und Kontrollkulturen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Gaps werden getrennt erfaßt und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt.

Zu erfassen sind auch Maßnahmen, die in den Hauptprüfungen auf Aberrationen gleichzeitig zur Bestimmung der Zytotoxizität aller behandelten und Negativkontrollkulturen durchgeführt werden.



Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Die Notwendigkeit der Bestätigung negativer Ergebnisse wurde in 1.4.3.3. dargelegt. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen und die Stoffwechsellaktivierungsbedingungen.

## 2.2 BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z.B. eine konzentrationsbezogene Zunahme oder reproduzierbare Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (3)(13). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine zahlenmäßige Zunahme der polyploiden Zellen deutet möglicherweise darauf hin, daß die Prüfsubstanz mitotische Prozesse zu hemmen und numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag. Eine zahlenmäßige Zunahme der Zellen mit endoreduplizierten Chromosomen ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (17)(18).

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt in diesem System als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde beim In-vitro-Chromosomenaberrationstest deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz in kultivierten somatischen Säugetierzellen strukturelle Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen in kultivierten somatischen Säugetierzellen hervorruft.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel

— Begründung für die Wahl des Vehikels;

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

Zellen:

- Typ und Herkunft der Zellen;
- Karyotypmerkmale und Eignung des verwendeten Zelltyps;
- ggf. Nichtvorhandensein von Mycoplasma;
- Angaben über die Dauer des Zellzyklus;
- Geschlecht der Blutspender, Vollblut oder separierte Lymphozyten, verwendetes Mitogen;
- ggf. Passagenanzahl;
- ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren
- Modalwert der Chromosomen.

Prüfbedingungen :

- Bezeichnung der Spindelgifte, deren Konzentration und Dauer der Zellexposition;
- Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z.B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;
- Medienzusammensetzung, ggf. CO<sub>2</sub>-Konzentration;
- Konzentration der Prüfsubstanz;
- Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- ggf. Zelldichte bei der Beimpfung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien,
- Positiv- und Negativkontrollen;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Kriterien für die Auswertung der Aberrationen;
- Anzahl der analysierten Metaphasen;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse :

- Toxizitätszeichen, z.B. Konfluenzgrad, Angaben zum Zellzyklus, Zellzahlen, Mitoseindex;
- Ausfällungszeichen;
- Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;
- Begriffsbestimmungen für Aberrationen, einschließlich Lücken;
- Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen mit getrennter Angabe des Chromosomenaberrationstyps für jede behandelte Kultur und Kontrollkultur;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen Mittelwerten und Standardabweichungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. **LITERATURHINWEISE**

1. Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (Hrsg.) Plenum Press, New York und London, 1-29.
2. Ishidate, M.Jr. und Sofuni, T. (1985). The *in vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Hrsg.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427-432.
3. Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. und Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environs. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), 1-175.
4. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. und Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
5. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. und Okumura, K., (1992). Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells. *Mutation Res.*, 268, 297-305.

6. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
7. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
8. Natarajan, A.T., Bates, A.D., van Buul, P.P.W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *in vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. *Mutation Res.*, 37, 83-90.
9. Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*. *Mutation Res.*, 66, 277-290.
10. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
11. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds) *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
12. Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, 241-261.
13. Richardson, C., Williams, D.A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D.O. and Phillips, B. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Kirkland, D.J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.
14. Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). replicate Flasks are not Necessary for *in vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, 139-149.
15. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.
16. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
17. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, 403-413.
18. Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

## B.11. MUTAGENITÄT – IN VIVO- TEST AUF CHROMOSOMENABERRATIONEN IN SÄUGETIERKNOCHENMARKZELLEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

#### 1.1 EINLEITUNG

Der In-Vivo-Test auf Chromosomenaberrationen in Säugetierzellen dient zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen, die von der Prüfsubstanz im Knochenmark von Säugetieren, in der Regel Nagetieren, ausgelöst werden (1)(2)(3)(4). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomen- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Eine Zunahme der Polyploidie ist möglicherweise ein Hinweis darauf, daß ein chemischer Stoff numerische Aberrationen hervorzurufen vermag. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, daß Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge, die Änderungen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen auslösen, an der Entstehung von Krebs bei Menschen und in Versuchssystemen beteiligt sind.

Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nagetiere eingesetzt. Zielgewebe ist dabei das Knochenmark, da es sich dabei um ein gefäßreiches Gewebe mit einer Population rasch proliferierender Zellen handelt, die sich leicht isolieren und aufarbeiten lassen. Andere Versuchstiere und Zielgewebe sind nicht Gegenstand dieser Methode.

Dieser Chromosomenaberrationstest ist insbesondere für die Bewertung der mutagenen Eigenschaften von Relevanz, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht, auch wenn diese bei den einzelnen Spezies und Geweben unterschiedlich sind. Ein In-vivo-Test ist auch für die weitere Untersuchung einer bei In-vitro-Prüfungen festgestellten mutagenen Wirkung von Nutzen.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, daß die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2 DEFINITIONEN

**Chromatidentypaberration:** strukturelle Chromosomenanomalie, gekennzeichnet durch Bruch einzelner Chromatiden oder Bruch und Reunion zwischen Chromatiden.

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

**Endoreduplikation:** Prozeß, bei dem der Kern nach einer S-Phase der DNA-Replikation keine Mitose durchläuft, sondern in eine weitere S-Phase eintritt. Das Ergebnis sind Chromosomen mit 4, 8, 16, ... Chromatiden.

Gap: achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatide(n).

**Numerische Aberration:** Abweichung der Chromosomenzahl vom Normalwert, der für die verwendeten Zellen charakteristisch ist.

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

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

### 1.3 PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz mittels einer geeigneten Expositionsform verabreicht und werden zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z.B. Colchicin oder Colcemid®) behandelt. Aus den Knochenmarkzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

### 1.4 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1 Vorbereitungen

##### 1.4.1.1 Versuchstiere

Gewöhnlich werden Ratten, Mäuse und chinesische Hamster verwendet, doch kommen auch andere geeignete Säugetierarten in Frage. Es sollten gesunde und geschlechtsreife junge Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn der Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

##### 1.4.1.2 *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert um 50-60 % anzustreben.

##### 1.4.1.3 *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

#### 1.4.1.4 *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen .

#### 1.4.2 **Prüfbedingungen**

##### 1.4.2.1 *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

##### 1.4.2.2 *Kontrollen*

Für jeden Versuch und jedes Geschlecht sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der behandelten Gruppen.

Die Positivkontrollen sollten *in vivo* strukturelle Aberrationen bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Probenahme erfolgt. Ggf. könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

<b>Substanz</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>EINECS-Nummer</b>
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen vorliegen. Erfolgt bei den Negativkontrollen nur eine einzige Probenahme, so ist dafür die erste Probenahme der günstigste Zeitpunkt. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

## 1.5 VERFAHREN

### 1.5.1 **Anzahl und Geschlecht der Tiere**

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muß pro Geschlecht mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen. Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, daß zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z.B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

### 1.5.2 **Behandlungsplan**

Die Prüfsubstanzen sind möglichst auf einmal zu verabreichen. Die Gabe kann aber auch in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt. Andere Verabreichungsschemata sollten wissenschaftlich begründet sein.

Wenn die Testsubstanz an einem Tag verabreicht wird, sollte zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten aufgearbeitet werden. Bei Nagern erfolgt die erste Probenahme in Anschluß an die Behandlung nach Ablauf eines Zeitraums, der der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus (der in der Regel 12 bis 18 Std. dauert) entspricht. Da die für die Aufnahme und Metabolisierung der Prüfsubstanz sowie für die Wirkung auf die Zellzykluskinetik benötigte Zeit den optimalen Zeitpunkt für die Feststellung von Chromosomenaberrationen beeinflussen kann, wird empfohlen, 24 Stunden nach der ersten Aufarbeitung eine weitere Aufarbeitung vorzunehmen. Werden Verabreichungsschemata gewählt, die über einen Tag hinausgehen, sollte die Probenahme im Anschluß an die letzte Behandlung nach Ablauf eines Zeitraums erfolgen, der der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht.

Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgiftes (z.B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Die Tiere werden dann zu einem geeigneten Zeitpunkt aufgearbeitet. Bei Mäusen beträgt der Zeitabstand ca. 3 bis 5 Stunden, beim chinesischen Hamster ca. 4 bis 5 Stunden. Aus dem Knochenmark werden Zellen gewonnen und auf Chromosomenaberrationen untersucht.



### 1.5.3 **Dosierungen**

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (5). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Aufarbeitung drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Aufarbeitung muß nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität im Knochenmark hervorruft (z.B. eine Reduzierung des Mitoseindex um mehr als 50 %).

### 1.5.4 **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung bei einer Dosis von mindestens 2000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Gentoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Bei Studien von längerer Dauer beträgt die Limit-Dosis 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von bis zu 14 Tagen und 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von mehr als 14 Tagen. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.5.5 **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von reizenden oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Minimum zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

### 1.5.6 **Chromosomenpräparation**

Unmittelbar nach der Tötung wird das Knochenmark gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt.

### 1.5.7 Analyse

Bei allen behandelten Tieren (einschließlich der Positivkontrollen) und unbehandelten Tieren der Negativkontrollgruppe ist der Mitoseindex als Gradmesser der Zytotoxizität in mindestens 1000 Zellen pro Tier zu bestimmen.

Bei jedem Tier sind mindestens 100 Zellen zu analysieren. Eine Reduzierung dieser Zahl ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird. Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die der Zahl  $2n \pm 2$  entspricht.

## 2. DATEN

### 2.1 AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier sind die Anzahl der bewerteten Zellen, die Zahl der Aberrationen pro Zelle und der Anteil der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen anzugeben. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Gaps werden getrennt erfaßt und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt. Gibt es keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Reaktionen der Geschlechter, so können die Daten für beide Geschlechter zur statistischen Analyse zusammengefaßt werden.

### 2.2 BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z.B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen oder eine eindeutige Zunahme der Anzahl der Zellen mit Aberrationen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (6). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine zahlenmäßige Zunahme der Polyploidie deutet möglicherweise darauf hin, daß die Prüfsubstanz numerische Chromosomenaberrationen hervorzurufen vermag. Eine zahlenmäßige Zunahme der Endoreduplikation ist möglicherweise ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz die Zellzyklusprogression zu hemmen vermag (7)(8).

Eine Prüfsubstanz, bei denen die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt in diesem System als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde des In-vivo-Chromosomenaberrationstests deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz im Knochenmark der untersuchten Spezies Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen im Knochenmark der untersuchten Spezies hervorruft.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in den allgemeinen Blutkreislauf bzw. in das spezifische Zielgewebe gelangen (z.B. systemische Toxizität).

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

##### Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

##### Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe;

##### Prüfbedingungen :

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;
- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Kriterien zur Bewertung von Aberrationen;
- Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Mitoseindex;
- Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe mit Mittelwerten und Standardabweichungen;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;
- Daten zu historischen Negativkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATURHINWEISE

1. Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt und J.M. Parry (Hrsg.). IRL Press, Oxford, Washington D.C., 275-306.
2. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. und Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.*, 189, 157-165.
3. Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. und Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Hrsg.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 115-141.
4. Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. und Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, 305-312.
5. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. und Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. und Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Hrsg.) Cambridge University Press, Cambridge. 184-232.
7. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.* 119, 403-413.
8. Huang, Y., Change, C. und Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362-1364.

## **B. 12. MUTAGENITÄT – *IN VIVO*-ERYTHROZYTEN-MIKROKERNTEST BEI SÄUGERN**

### **1. METHODE**

Die Methode entspricht der OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

#### **1.1 EINLEITUNG**

Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugern dient zum Nachweis einer von der Prüfsubstanz in den Chromosomen oder im mitotischen Apparat von Erythroblasten hervorgerufenen Schädigung durch Analyse der Erythrozyten, aus dem Knochenmark und/oder dem peripheren Blut von Tieren, in der Regel Nagern.

Zweck des Mikrokerntests ist der Nachweis von Substanzen, die zytogenetische Schäden hervorrufen, durch die es zur Bildung von Mikrokernen) mit zurückgebliebenen Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen kommt.

Wenn sich ein Knochenmarkerythroblast zu einem polychromatischen Erythrozyten entwickelt, wird der Hauptkern ausgestoßen. Dabei kann aber ein möglicherweise entstandener Mikrokern im ansonsten entkernten Zytoplasma verbleiben. Die Sichtbarmachung der Mikrokern wird in diesen Zellen dadurch erleichtert, daß sie keinen Hauptkern aufweisen. Eine Zunahme der Häufigkeit von polychromatischen Mikrokern-haltige Erythrozyten in behandelten Tieren deutet auf die Verursachung einer Chromosomenschädigung hin.

Routinemäßig wird bei diesem Test das Knochenmark von Nagern verwendet, da in diesem Gewebe polychromatische Erythrozyten erzeugt werden. Zur Bestimmung von nicht ausgereiften (polychromatischen) Mikrokern-haltige Erythrozyten im peripheren Blut kann aber auch jede Spezies herangezogen werden, bei der erwiesenermaßen die Milz keine Mikrokern-haltige Erythrozyten abzubauen vermag oder eine ausreichende Sensibilität für den Nachweis von Agenzien, die strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen verursachen, gegeben ist. Mikrokern lassen sich mit Hilfe einer Reihe von Kriterien differenzieren . Dazu zählen die Feststellung des Vorhandenseins oder Fehlens einer Kinetochor- bzw. Zentromer-DNA in den Mikrokernen. Hauptendpunkt ist die Häufigkeit der nicht ausgereiften (polychromatischen) Mikrokern-haltige Erythrozyten. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, kommt aber auch der Anteil der Mikrokern enthaltenden ausgereiften (normochromatischen) Erythrozyten an einer bestimmten Zahl ausgereifter Erythrozyten im peripheren Blut als Endpunkt des Tests in Betracht.

Der In-vivo-Mikrokerntest bei Säugetieren ist für die Bewertung des mutagenen Risikos von besonderer Bedeutung, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht, auch wenn diese bei den einzelnen Spezies, Gewebearten und genetischen Endpunkten unterschiedlich sind. Ein In-vivo-Versuch ist auch für weitere Untersuchungen der mittels In-vitro-System festgestellten mutagenen Wirkungen von Nutzen.

Gibt es Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Tests nicht geeignet.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2 DEFINITIONEN

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

**Mikrokerne:** Kleine Kerne zusätzlich zu den Hauptkernen der Zellen und von diesen getrennt , die während der Telophase der Mitose (Meiose) durch zurückgebliebene Chromosomenteile oder ganze Chromosomen gebildet werden.

**Normochromatischer Erythrozyt:** Reifer Erythrozyt, der keine Ribosomen aufweist und sich von unreifen polychromatischen Erythrozyten mit Hilfe ribosomenselektiver Farbstoffe unterscheiden läßt.

**Polychromatischer Erythrozyt:** Unreifer Erythrozyt, der sich in einer Zwischenstufe der Entwicklung befindet und noch Ribosomen enthält, so daß er sich mit Hilfe ribosomenselektiver Farbstoffe von reifen normochromatischen Erythrozyten unterscheiden läßt.

## 1.3 PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Prüfsubstanz wird den Tieren über einen geeigneten Applikationsweg verabreicht. Bei Verwendung von Knochenmark werden sie zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Das Knochenmark wird entnommen, präpariert und gefärbt (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Findet peripheres Blut Verwendung, so wird es zu geeigneten Zeitpunkten nach der Behandlung entnommen, und es werden Ausstrichpräparate hergestellt und gefärbt (4)(8)(9)(10). Bei Versuchen mit peripherem Blut sollte zwischen der letzten Exposition und der Zellgewinnung möglichst wenig Zeit vergehen. Die Präparate werden auf das Vorhandensein von Mikrokerne untersucht.

## 1.4 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

### 1.4.1 Vorbereitungen

#### 1.4.1.1 Versuchstiere

Bei Verwendung von Knochenmark ist der Einsatz von Mäusen oder Ratten zu empfehlen, doch kommt jede geeignete Säugerspezies in Betracht. Wird peripheres Blut verwendet, so empfiehlt sich der Einsatz von Mäusen. Es kommt aber auch jede andere geeignete Säugerspezies in Frage, wenn es sich um eine Spezies handelt, bei der erwiesenermaßen die Milz keine Mikrokern-haltige Erythrozyten abbaut oder eine ausreichende Empfindlichkeit für den Nachweis von Agenzien, die strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen verursachen, gegeben ist. Es sollten junge gesunde Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn der Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert möglichst gering sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

#### 1.4.1.2 *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60 % anzustreben.

#### 1.4.1.3 *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt.

#### 1.4.1.4 *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

### 1.4.2 **Prüfbedingungen**

#### 1.4.2.1 *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

#### 1.4.2.2 *Kontrollen*

Bei jedem Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativkontrollen für jedes Geschlecht anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die Positivkontrollen sollten *in vivo* Mikrokerne bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Aufarbeitung erfolgt. Gegebenenfalls könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

<b>Substanz</b>	<b>CAS-Nummer</b>	<b>EINECS-Nummer</b>
Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-ethyl-N-nitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die nur ein Lösungsmittel oder Vehikel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Mikrokernen vorliegen. Erfolgt bei den Negativkontrollen nur eine einzige Aufarbeitung, so ist dafür die erste Aufarbeitung der günstigste Zeitpunkt. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

Bei Verwendung von peripherem Blut ist als gleichzeitige Negativkontrolle möglicherweise auch eine vor der Behandlung entnommene Probe vertretbar, jedoch nur bei Kurzzeitstudien an peripherem Blut (z.B. 1 bis 3 Gaben) und unter der Voraussetzung, daß sich die gewonnenen Daten in dem Bereich bewegen, den die historische Kontrolle erwarten läßt.

## 1.5 VERFAHREN

### 1.5.1 Anzahl und Geschlecht der Tiere

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muß pro Geschlecht mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen (11). Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, daß zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z.B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

### 1.5.2 Behandlungsplan

Es läßt sich kein Standard-Behandlungsplan (d.h. 1, 2 oder mehr Gaben im Abstand von 24 Std.) empfehlen. Die bei längerer Verabreichung entnommenen Stichproben sind akzeptabel, solange für diese Studie ein positives Ergebnis nachgewiesen wurde bzw. solange bei einer negativen Studie Toxizität nachgewiesen oder die Limit-Testdosis verwendet wurde und die Verabreichung bis zum Zeitpunkt der Probenahme erfolgte. Die Gabe kann aber auch in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt.

Die Prüfung kann auf zweierlei Weise durchgeführt werden:

- (a) Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz einmal. Knochenmark wird mindestens zweimal aufgearbeitet, wobei die erste Aufarbeitung frühestens 24 h nach Applikation und die letzte spätestens 48 h nach Applikation erfolgen muß. Zwischen den Aufarbeitungszeiten müssen angemessene Abstände sein. Wird eine Probe bereits früher als 24 Stunden nach der Behandlung entnommen, so ist dies zu begründen. Bei Verwendung peripheren Bluts werden mindestens zweimal Proben entnommen, wobei die erste Probenahme frühestens 36 Stunden nach der Behandlung und die letzte spätestens 72 Stunden nach der Behandlung zu erfolgen hat und nach der ersten Probenahme entsprechende Abstände einzuhalten sind. Wird bei einer Probenahme eine positive Reaktion verzeichnet, so ist die Entnahme weiterer Proben nicht erforderlich.
- (b) Bei zwei oder mehr Gaben pro Tag (d.h. zwei oder mehr Gaben im Abstand von 24 Stunden) sind die Proben bei der Verwendung von Knochenmark einmal zwischen 18 und 24 Stunden nach der letzten Gabe und bei Verwendung von peripherem Blut einmal zwischen 36 und 48 Stunden nach der letzten Gabe zu entnehmen. (12).

Bei Bedarf können zu anderen Zeitpunkten weitere Probenahmen erfolgen.



### 1.5.3 **Dosierungen**

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (13). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Probenahme drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Probenahme muß nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität im Knochenmark hervorruft (z.B. eine Reduzierung des Anteils unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten im Knochenmark oder peripheren Blut).

### 1.5.4 **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist eine Gentoxizität angesichts von Daten für strukturverwandte Substanzen nicht zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Bei Studien von längerer Dauer beträgt die Limit-Dosis 2000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von bis zu 14 Tagen und 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag bei einer Behandlungsdauer von mehr als 14 Tagen. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.5.5 **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von reizenden oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfolumens dadurch auf ein Minimum zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

### 1.5.6 **Knochenmark-/Blutpräparation**

Die Knochenmarkzellen werden in der Regel unmittelbar nach der Tötung aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen gewonnen. Dabei werden die Zellen gewöhnlich aus den Oberschenkel- oder Schienbeinknochen entnommen und unter Verwendung erprobter Methoden präpariert und gefärbt. Das periphere Blut wird aus der Schwanzvene oder einem anderen geeigneten Blutgefäß entnommen. Die Blutzellen werden sofort supravital gefärbt (8)(9)(10), oder es werden Ausstrichpräparate hergestellt und dann gefärbt. Durch Verwendung eines DNA-spezifischen Farbstoffs [z.B. Acridin Orange (14) oder Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)] lassen sich bestimmte Artefakte vermeiden, die bei Verwendung eines nicht DNA-spezifischen Farbstoffs auftreten. Trotz dieses Vorteils ist aber die Verwendung herkömmlicher Farbstoffe (z.B. Giemsa) nicht ausgeschlossen. Zusätzliche Systeme [z.B. Cellulosesäulen zur Entfernung kernhaltiger Zellen (16)] können ebenfalls verwendet werden, falls sich diese Systeme nachweislich bei der Mikrokernpräparation im Labor bewährt haben.

### 1.5.7 Analyse

Der Anteil unreifer Erythrozyten an der Gesamtzahl (unreife + reife Erythrozyten) wird für jedes Tier bestimmt, indem bei Verwendung von Knochenmark mindestens 200 Erythrozyten und bei Verwendung von peripherem Blut mindestens 1000 Erythrozyten gezählt werden (17). Alle Objektträger, auch die für Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Analyse von unabhängiger Seite zu kodieren. Je Tier werden mindestens 2000 unreife Erythrozyten auf das Vorhandensein von unreifen Mikrokern-haltige Erythrozyten untersucht. Zusätzlichen Aufschluß kann die Untersuchung reifer Erythrozyten auf Mikrokerne geben. Bei der Analyse der Objektträger sollte der Anteil der unreifen Erythrozyten nicht weniger als 20 % des Kontrollwertes betragen. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, können auch mindestens 2000 reife Erythrozyten pro Tier auf das Vorhandensein von Mikrokerne untersucht werden. Automatisierte Analysesysteme (Bildanalyse und Zellsuspensions-Durchflußzytometrie) stellen bei entsprechender Begründung und Validierung vertretbare Alternativen zur manuellen Auswertung dar.

## 2. DATEN

### 2.1 AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier gesondert sind die Anzahl der bewerteten unreifen Erythrozyten, die Anzahl der unreifen Mikrokern-haltige Erythrozyten und der Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamterthrozytenzahl anzugeben. Werden die Tiere kontinuierlich über einen Zeitraum von 4 Wochen oder länger behandelt, sollten auch die Daten über die reifen Erythrozyten angegeben werden, wenn sie erfaßt wurden. Für jedes Tier wird der Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamterthrozytenzahl und ggf. der Anteil der Mikrokern-haltige Erythrozyten angegeben. Gibt es keine Anhaltspunkte für unterschiedliche Reaktionen der Geschlechter, so können die Daten für beide Geschlechter zur statistischen Analyse zusammengefaßt werden.

### 2.2 BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z.B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl von Mikrokernzellen oder eine deutliche Zunahme der Anzahl von Mikrokernzellen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (18)(19). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Test als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Ergebnisse des Mikrokerntests deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz Mikrokerne verursacht, die infolge einer Chromosomenschädigung oder einer Schädigung des mitotischen Apparats in den Erythroblasten der geprüften Spezies entstehen. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen in den unreifen Erythrozyten der geprüften Spezies keine Mikrokerne verursacht.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in den allgemeinen Blutkreislauf oder in das spezifische Zielgewebe gelangen (z.B. systemische Toxizität).

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe;

Prüfbedingungen :

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;
- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Kriterien zur Bewertung unreifer Mikrokern-haltige Erythrozyten;
- Zahl der analysierten Zellen pro Tier;
- Kriterien zur Bewertung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig.

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Anteil der unreifen Erythrozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten;
- Anzahl der unreifen Mikrokern-haltige Erythrozyten, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der unreifen Mikrokern-haltige Erythrozyten je Gruppe;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- verwendete statistische Analysen und Methoden;
- Daten zu gleichzeitigen und historischen Negativkontrollen;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. **LITERATURHINWEISE**

1. Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, 187-190.
2. Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, 9-15.
3. Heddle, J.A., Salamone, M.F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J.G. und Newell, G.W. (1983). The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* 123: 61-118.
4. Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F. und Heddle, J.A. (1990). The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, 29-80.
5. MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., und Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: "Developments in Science and Practice of Toxicology", Hrsg.. A.W. Hayes, R.C. Schnell und T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 555-558.
6. MacGregor, J.T., Heddle, J.A. Hite, M., Margolin, G.H., Ramel, C., Salamone, M.F., Tice, R.R., und Wild, D. (1987) Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes. *Mutation Res.* 189: 103-112.
7. MacGregor, J.T., Wehr, C.M., Henika, P.R., und Shelby, M.E. (1990). The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 14: 513-522.
8. Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. und Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. *Mutation Res.*, 245, 245-249.
9. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS. MMS. *Mutation Res.*, 278, 83-98.

10. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS. MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan)(1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 153-159.
11. Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. und Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, 293-304.
12. Higashikuni, N. und Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of  $30 \pm 6$  h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 313-319.
13. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. und Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 313-319.
14. Hayashi, M., Sofuni, T. und Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, 241-247.
15. MacGregor, J.T., Wehr, C.M. und Langlois, R.G. (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, 269-275.
16. Romagna, F. und Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, 91-104.
17. Gollapudi, B. und McFadden, L.G. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 347, 97-99.
18. Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. und Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Hrsg.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 115-141.
19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. und Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Hrsg.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 184-232.

## B. 13/14. MUTAGENITÄT : RÜCKMUTATIONSTEST UNTER VERWENDUNG VON BAKTERIEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht den OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

#### 1.1 EINLEITUNG

Beim Rückmutationstest an Bakterien werden Stämme von *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*, die Aminosäure benötigen, zum Nachweis von Punktmutationen verwendet, die Substitution, Addition oder Deletion eines oder mehrerer DNA-Basenpaare umfassen (1)(2)(3). Der unter Verwendung von Bakterien durchgeführte Rückmutationstest beruht auf dem Nachweis von Mutationen, durch die Mutationen in den entsprechenden Stämmen rückgängig gemacht und die funktionale Kapazität der Bakterien zur Synthesisierung einer essentiellen Aminosäure wiederhergestellt wird. Die Revertanten-Bakterien lassen sich an ihrer Fähigkeit zum Wachstum ohne die vom Elternstamm benötigte Aminosäure erkennen.

Punktmutationen sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen. Es spricht manches dafür, daß Punktmutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgen somatischer Zellen an der Entstehung von Krebs bei Menschen und Versuchstieren beteiligt sind. Der Rückmutationstest an Bakterien ist wenig zeitaufwendig, kostengünstig und relativ leicht durchzuführen. Viele Versuchsstämme weisen mehrere Merkmale auf, die ihnen eine größere Empfindlichkeit beim Nachweis von Mutationen verleihen, darunter reaktive DNA-Sequenzen an den Reversionsorten, erhöhte Zelldurchlässigkeit gegenüber großen Molekülen und Eliminierung von DNA-Reparatursystemen oder Anstieg der fehlerhaften DNA-Reparaturprozesse. Die Spezifität der Versuchsstämme kann wertvollen Aufschluß über die Typen der von gentoxischen Agenzien ausgelösten Mutationen liefern. Für Rückmutationstests unter Verwendung von Bakterien steht eine sehr umfangreiche Bestand an Ergebnissen für eine Vielzahl von Strukturen zur Verfügung, und es wurden gründlich erprobte Methoden zur Prüfung von Chemikalien mit unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften, darunter flüchtige Verbindungen, entwickelt.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2 DEFINITIONEN

**Ein Rückmutationstest** bei *Salmonella typhimurium* oder *Escherichia coli* dient zum Nachweis von Mutationen, die in einem Stamm auftreten, der eine Aminosäure (Histidin bzw. Tryptophan) benötigt, und zur Bildung eines Stammes führen, der nicht auf eine Aminosäurezufuhr von außen angewiesen ist..

**Basenpaaraustauschmutagene** sind Agenzien, die in DNA eine Basenveränderung verursachen. Bei einem Reversionstest kann diese Veränderung am Ort der ursprünglichen Mutation oder an einem zweiten Ort des bakteriellen Genoms auftreten.

**Rasterschubmutagene** sind Agenzien, die eine Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren in der DNA verursachen, wodurch sich der Leseraster der RNS verändert.

Beim Rückmutationstest an Bakterien werden prokaryotische Zellen verwendet, die sich im Hinblick auf Faktoren wie Aufnahme, Stoffwechsel, Chromosomenstruktur und DNA-Reparaturprozesse von Säugetierzellen unterscheiden. *In vitro* durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit einem *In-vitro*-Metabolisierungssystem lassen sich aber die *In-vivo*-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Der Test gibt daher keinen direkten Aufschluß über das mutagene und kanzerogene Potential einer Substanz bei Säugetieren.

Der unter Verwendung von Bakterien durchgeführte Rückmutationstest dient in der Regel zur Erstuntersuchung auf genotoxische Aktivität, insbesondere auf Punktmutationen. Aus dem umfangreichen Datenbestand geht hervor, daß sich zahlreiche chemische Stoffe, die bei diesem Test einen positiven Befund ergeben, auch bei anderen Prüfungen als mutagen erweisen. Es gibt allerdings Beispiele dafür, daß mutagene Agenzien nicht durch diesen Test nachgewiesen werden. Zurückzuführen ist dies auf die spezifische Art des ermittelten Endpunkts und auf Unterschiede in der Stoffwechselaktivierung bzw. in der Bioverfügbarkeit. Andererseits können Faktoren, die eine verstärkte Empfindlichkeit des Rückmutationstests an Bakterien bewirken, zu einer Überbewertung der mutagenen Wirkung führen.

Der Rückmutationstest an Bakterien eignet sich möglicherweise nicht zur Bewertung bestimmter Klassen von chemischen Substanzen, so etwa von stark bakteriziden Verbindungen (z.B. bestimmten Antibiotika) und Stoffen, die vermutlich (oder nachweislich) in das Zellreplikationssystem von Säugetieren eingreifen (z.B. bestimmten Topoisomerasehemmern und Nucleosidanalogen). In diesen Fällen sind wohl Mutationstests an Säugetieren eher angebracht.

Zahlreiche Verbindungen, die bei diesem Test einen positiven Befund ergeben, haben zwar eine kanzerogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation. Ausschlaggebend ist die chemische Klasse, und bestimmte Kanzerogene sind durch diesen Test nicht nachweisbar, weil ihre Wirkung auf anderen, nicht genotoxischen Mechanismen oder in Bakterienzellen fehlenden Mechanismen beruht.

Suspensionen von Bakterienzellen werden mit und ohne ein exogenes Stoffwechselaktivierungssystem mit der Prüfsubstanz behandelt. Bei der Platteninkorporationsmethode werden die Suspensionen mit Schichtagar vermischt und unmittelbar danach auf einem Minimalmedium ausgestrichen. Bei der Vorinkubationsmethode wird das Prüfgemisch bebrütet und dann mit Schichtagar vermischt, bevor es auf einem Minimalmedium ausgestrichen wird. Bei beiden Verfahren wird nach einer Inkubationszeit von zwei oder drei Tagen die Anzahl der Revertanten-Kolonien bestimmt und mit der Anzahl der spontan Revertanten-Kolonien auf den Lösungsmittel-Kontrollplatten verglichen.

Es wurden verschiedene Verfahren zur Durchführung des Rückmutationstests an Bakterien beschrieben. Zu den gebräuchlichsten Verfahren zählen die Platteninkorporationsmethode (1)(2)(3)(4), die Vorinkubationsmethode (2)(3)(5)(6)(7)(8), die Fluktuationmethode (9)(10) und die Suspensionsmethode (11). Beschrieben wurden auch Abänderungen zur Untersuchung von Gasen oder Dämpfen (12).

Die hier beschriebenen Verfahren beziehen sich im wesentlichen auf die Platteninkorporations- und Vorinkubationsmethode. Beide sind für die Durchführung von Versuchen mit und ohne Stoffwechselaktivierungssystem geeignet. Einige Substanzen lassen sich möglicherweise besser mit der Vorinkubationsmethode nachweisen. Sie gehören chemischen Klassen an, zu denen unter anderem kurzkettige aliphatische Nitrosamine, bivalente Metalle, Aldehyde, Azofarbstoffe und Diazoverbindungen, Pyrollizidinalkaloide, Allylverbindungen und Nitroverbindungen zählen (3). Dabei wird berücksichtigt anerkannt, daß bestimmte Klassen von Mutagenen bei Anwendung von Standardverfahren wie der Platteninkorporations- oder Vorinkubationsmethode nicht immer nachweisbar sind. Diese sind als „Sonderfälle“ anzusehen, zu deren Nachweis unbedingt alternative Verfahren eingesetzt werden sollten. Es könnten sich die folgenden „Sonderfälle“ ergeben (mit Beispielen für möglicherweise geeignete Nachweisverfahren): Azofarbstoffe und Diazoverbindungen (3)(5)(6)(13), Gase und flüchtige chemische Stoffe (12)(14)(15)(16) sowie Glycoside (17)(18). Abweichungen von den Standardverfahren sind wissenschaftlich zu begründen.

## 1.5 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

### 1.5.1 Vorbereitungen

#### 1.5.1.1 Bakterien

Frische Bakterienkulturen sollten bis zur späten exponentiellen oder frühen stationären Wachstumsphase kultiviert werden (ca.  $10^9$  Zellen pro ml). Kulturen, die sich im Spätstadium der stationären Phase befinden, sind nicht heranzuziehen. Entscheidend ist dabei, daß die zur Prüfung verwendeten Kulturen einen hohen Anteil an lebensfähigen Bakterien enthalten. Der Anteil läßt sich entweder anhand historischer Kontrolldaten über Wachstumskurven bestimmen oder aber für jeden Versuch gesondert durch Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Zellen mittels eines Plattentests.

Die empfohlene Inkubationstemperatur beträgt 37°C.

Es sind mindestens fünf Bakterienstämme zu verwenden. Dazu sollten vier Stämme von *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 oder TA97a oder TA97; TA98; und TA100) gehören, die erwiesenermaßen zuverlässige und in anderen Labors reproduzierbare Ergebnisse liefern. Diese vier Stämme von *S. typhimurium* weisen am primären Reversionslocus GC-Basenpaare auf. Bekannt ist, daß möglicherweise bestimmte oxidierende Mutagene, cross-linking induzierende Agenzien und Hydrazine damit nicht nachzuweisen sind. Diese Substanzen lassen sich durch Stämme von *E. coli* WP2 oder *S. typhimurium* TA102 (19) nachweisen, die am primären Reversionslocus ein AT-Basenpaar aufweisen. Empfohlen wird daher eine Kombination folgender Stämme:

- *S. typhimurium* TA1535 und
- *S. typhimurium* TA1537 oder TA97 oder TA97a und
- *S. typhimurium* TA98 und
- *S. typhimurium* TA100 und
- *E. coli* WP2 uvrA oder *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) oder *S. typhimurium* TA102.

Zum Nachweis cross-linking induzierender Mutagene ist es vielleicht ratsam, TA102 einzubeziehen oder einen reparatur-profizienten Stamm von *E. coli* [z.B. *E. coli* WP2 oder *E. coli* WP2 (pKM101)] hinzuzugeben.



Zur Vorbereitung der Stammkulturen, zur Verifizierung der Marker und zur Lagerung sollten bewährte Verfahren verwendet werden. Der wachstumsbedingte Aminosäurebedarf ist für jedes tiefgefrorene Stammkulturpräparat nachzuweisen (Histidin bei Stämmen von *S. typhimurium* und Tryptophan bei Stämmen von *E. coli*). Auch andere phänotypische Merkmale sind zu überprüfen, so ggf. das Vorhandensein oder Fehlen von R-Faktor-Plasmiden [d.h. die Ampicillinresistenz bei den Stämmen TA98, TA100 und TA97a oder TA97, WP2 uvrA und WP2 uvrA (pKM101) und die Ampicillin- + Tetracyclinresistenz bei den Stämmen TA102]; das Vorhandensein charakteristischer Mutationen (d.h. rfa-Mutation bei *S. typhimurium* durch Empfindlichkeit gegenüber Kristallviolett und uvrA-Mutation bei *E. coli* oder uvrB-Mutation bei *S. typhimurium* durch Empfindlichkeit gegenüber ultraviolettem Licht) (2)(3). Zudem sollten die Stämme eine Anzahl von Spontan-Revertanten-Kolonien in Häufigkeitsbereichenaufweisen, die anhand der historischen Kontrolldaten des Labors zu erwarten sind, und möglichst innerhalb des in der Literatur angegebenen Bereichs liegen.

#### 1.5.1.2 Medium

Verwendet werden geeigneter Minimalagar (z.B. aus Vogel-Bonner-Minimalmedium E und Glucose) und Schichtagar mit Histidin und Biotin oder Tryptophan, damit mehrere Zellteilungen erfolgen können (1)(2)(9).

#### 1.5.1.3 Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Bakterien mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (1)(2) oder einem Gemisch aus Phenobarbital und  $\beta$ -Naphthoflavon (18)(20)(21) vorbehandelt wurden. Die post-mitochondriale Fraktion wird im S9-Gemisch in der Regel in Konzentrationen von 5 bis 30 % v/v verwendet. Wahl und Status des Stoffwechselaktivierungssystems sind möglicherweise von der geprüften chemischen Klasse abhängig. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der post-mitochondrialen Fraktion zu verwenden. Bei Azofarbstoffen und Diazoverbindungen ist möglicherweise eher der Einsatz eines reduktiven Stoffwechselaktivierungssystems angebracht (6)(13).

#### 1.5.1.4 Prüfsubstanz/Zubereitung

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Behandlung der Bakterien in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und es sollte mit dem Überleben der Bakterien und der S9-Aktivität kompatibel sein (22). Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein.

## 1.5.2 Prüfbedingungen

### 1.5.2.1 Versuchsstämme (siehe 1.5.1.1)

### 1.5.2.2 Expositionskonzentrationen

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration der Prüfsubstanz zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität und die Löslichkeit im Endgemisch.

Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Unlöslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen. Aufschluß über die Zytotoxizität geben der zahlenmäßige Rückgang der Revertanten-Kolonien, der Wegfall bzw. die Verkleinerung des Hintergrundrasens oder die Überlebensrate der behandelten Kulturen. Die Zytotoxizität einer Substanz verändert sich möglicherweise bei Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems. Die Unlöslichkeit sollte als Ausfällung im Endgemisch unter realen Prüfbedingungen ermittelt werden und mit dem bloßen Auge erkennbar sein.

Bei löslichen nicht zytotoxischen Substanzen wird eine maximale Prüfkonzentration von 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte empfohlen. Im Falle nicht zytotoxischer Substanzen, die bei 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte nicht löslich sind, sollte eine oder mehrere der geprüften Konzentrationen im Endgemisch unlöslich sein. Prüfsubstanzen, die sich bereits unter 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte als zytotoxisch erweisen, sind bis zu einer zytotoxischen Konzentration zu prüfen. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

Es sind mindestens fünf verschiedene analysierbare Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden, wobei beim ersten Versuch der Abstand zwischen den Prüfpunkten etwa eine halbe Log-Phase (d.h.  $\sqrt{10}$ ) beträgt. Kleinere Abstände sind ggf. angebracht, wenn eine Konzentrations-Effect-Beziehung untersucht wird. Bei der Bewertung von Substanzen, die größere Mengen an potentiell mutagenen Verunreinigungen enthalten, ist die Prüfung bei Konzentrationen über 5 mg/Platte bzw. 5 µl/Platte in Betracht zu ziehen.

### 1.5.2.3 Negativ- und Positivkontrollen

Für jeden Versuch sind gleichzeitig stammspezifische Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit oder ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Für die Positivkontrollen sind Konzentrationen zu wählen, die die Wirksamkeit des jeweiligen Versuchs belegen.

Bei Versuchen mit Stoffwechselaktivierungssystem sollten die Positivkontrollsubstanzen anhand der verwendeten Bakterienstämme ausgewählt werden.

Die folgenden Substanzen gelten als Beispiele für geeignete Positivkontrollen bei Versuchen mit Stoffwechselaktivierung:

CA-Nummer	EINECS-Nummer	Bezeichnung
781-43-1	212-308-4	9,10-Dimethylantracen
57-97-6	200-359-5	7,12-Dimethylbenz[ <i>a</i> ]anthracen
50-32-8	200-028-5	Benzo[ <i>a</i> ]pyren
613-13-8	210-330-9	2-Aminoanthracen
50-18-0	200-015-4	Cyclophosphamid
6055-19-2		Cyclophosphamidmonohydrat

Die folgende Substanz eignet sich als Positivkontrolle bei der reduktiven Stoffwechselaktivierungsmethode

573-58-0	209-358-4	Kongorot
----------	-----------	----------

2-Aminoanthracen sollte nicht als alleiniger Gradmesser für die Wirksamkeit des S9-Gemischs dienen. Bei Verwendung von 2-Aminoanthracen sollte jede Charge von S9 ebenfalls durch ein Mutagen gekennzeichnet sein, das eine Stoffwechselaktivierung durch mikrosomale Enzyme, z.B. Benzo[a]pyren oder Dimethylbenzanthracen, erfordert.

Die folgenden Substanzen sind Beispiele für stammspezifische Positivkontrollen bei Versuchen ohne exogenes Stoffwechselaktivierungssystem:

CAS-Nummer	EINECS-Nummer	Bezeichnung	Stamm
26628-22-8	247-852-1	Natriumazid	TA 1535 und TA 100
607-57-8	210-138-5	2-Nitrofluoren	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-Aminoacridin	TA 1537, TA 97 und TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 und TA 97a
80-15-9	201-254-7	Cumolhydroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	Mitomycin C	WP2 uvrA und TA102
70-25-7	200-730-1	N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin	WP2, WP2uvrA und WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-Nitroquinolin-1-oxid	WP2, WP2uvrA und WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		Furylfuramid (AF2)	Plasmide enthaltende Stämme

Es können auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen verwendet werden. Ggf. sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören, wie der Prüfstoff.

Es sind Negativkontrollen, die allein aus dem Lösungsmittel oder Vehikel ohne Prüfsubstanz bestehen und auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden, anzulegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

### 1.5.3 **Verfahren**

Bei der Platteninkorporationsmethode (1)(2)(3)(4) ohne Stoffwechselaktivierung werden gewöhnlich 0,05 ml oder 0,1 ml Prüflösung, 0,1 ml frische Bakterienkultur (mit ca.  $10^8$  lebensfähigen Zellen) und 0,5 ml sterile Pufferlösung mit 2,0 ml Schichtagar vermischt. Für Ansätze mit Stoffwechselaktivierung, werden gewöhnlich 0,5 ml Stoffwechselaktivierungsgemisch, das eine ausreichenden Menge post-mitochondrialer Fraktion (im Bereich von 5 bis 30% v/v im Stoffwechselaktivierungsgemisch) enthält, mit Schichtagar (2,0 ml) und zugleich mit den Bakterien und der Prüfsubstanz/Prüflösung vermischt. Der Inhalt jedes Röhrchens wird vermischt und auf der Oberfläche einer Minimalagarplatte ausgegossen. Vor der Inkubation läßt man den Schichtagar verfestigen.

Bei der Vorinkubationsmethode (2)(3)(5)(6) wird die Prüfsubstanz/Prüflösung ca. 20 Minuten oder länger bei 30-37°C mit dem Versuchsstamm (der ca.  $10^8$  lebensfähige Zellen enthält) und der sterilen Pufferlösung oder dem Stoffwechselaktivierungssystem (0,5 ml) vorinkubiert, bevor sie mit dem Schichtagar vermischt und auf der Oberfläche einer Minimalagarplatte ausgegossen wird. Gewöhnlich werden 0,05 oder 0,1 ml Prüfsubstanz/Prüflösung, 0,1 ml Bakterien und 0,5 ml S9-Gemisch oder sterile Pufferlösung mit 2,0 ml Schichtagar vermischt. Die Röhrchen sind während der Vorinkubation mit Hilfe eines Schüttlers zu belüften.

Um die Schwankungsbreite hinreichend beurteilen zu können, sind für jede Dosisstufe drei Platten anzulegen. Die Verwendung von zwei Platten ist vertretbar, wenn dies wissenschaftlich begründet wird. Durch den gelegentlichen Verlust einer Platte wird der Versuch nicht zwangsläufig entwertet.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z.B. in hermetisch verschlossenen Gefäßen (12)(14)(15)(16).

### 1.5.4 **Inkubation**

Sämtliche Platten des jeweiligen Versuchs sind 48 bis 72 Stunden bei 37°C zu bebrüten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte ermittelt.

## 2. DATEN

### 2.1 AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Die Daten sind als Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte anzugeben. Die Anzahl der Revertanten-Kolonien sowohl auf den Negativkontrollplatten (Lösungsmittelkontrolle und ggf. unbehandelte Kontrolle) als auch auf den Positivkontrollplatten ist ebenfalls zu dokumentieren. Für die Prüfsubstanz und die Positivkontrollen sowie Negativkontrollen (unbehandelte und/oder Lösungsmittelkontrollen) sind die Zahlenwerte der einzelnen Platten, die mittlere Anzahl der Rvertanten-Kolonien je Platte und die Standardabweichung aufzuführen.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Negative Befunde sind durch Einzelfallprüfung zu bestätigen. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Befunde nicht für notwendig erachtet wird, ist dies zu begründen. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen, die Prüfmethode (Platteninkorporation oder flüssige Vorinkubation) und der Stoffwechselaktivierungsstatus.

### 2.2 BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z.B. eine konzentrationsbezogene Zunahme im Prüfbereich und/oder eine reproduzierbare Zunahme der Anzahl der Rvertanten-Kolonien je Platte bei einer oder mehreren Konzentrationen in mindestens einem Stamm mit oder ohne Stoffwechselaktivierungssystem (23). Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (24). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Versuch als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde beim Rückmutationstest an Bakterien deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz durch Basenaustausch oder Rasterverschiebungen Punktmutationen im Genom von *Salmonella typhimurium* und/oder *Escherichia coli* hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen bei den geprüften Spezies keine mutagene Wirkung auslöst.

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten :

Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt.

Stämme:

- verwendete Stämme;
- Anzahl der Zellen je Kultur;
- Merkmale des Stammes.

Prüfbedingungen:

- Menge der Prüfsubstanz je Platte (mg/Platte oder µl/Platte) mit Begründung für die Wahl der Dosis und Anzahl der Platten je Konzentration;
- verwendete Medien;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien,
- Behandlungsverfahren.

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Ausfällungszeichen;
- Zählwerte der einzelnen Platten;
- mittlere Anzahl der Revertanten-Kolonien je Platte und Standardabweichung;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

**LITERATURHINWEISE**

1. Ames, B.N., McCann, J. und Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
2. Maron, D.M. und Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
3. Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. und Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, 217-233.
4. Kier, L.D., Brusick D.J., Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T.K. und Ray V. (1986). The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 168, 69-240.
5. Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. und Hashimoto, Y. (1975). Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, 91-96.
6. Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. und Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Hrsg. Norporth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 273-285.
7. Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. und Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Hrsg. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, 13-61.
8. Aeschacher, H.U., Wolleb, U. und Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 167-177.
9. Green, M.H.L., Muriel, W.J. und Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, 33-42.
10. Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. und J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Hrsg. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. und Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 141-161.
11. Thompson, E.D. und Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, 453-465.
12. Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. und T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, 335-344.
13. Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. und Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Res.*, 136, 33-47.
14. Zeiger, E., Anderson, B.E., Haworth, S., Lawlor, T. und Mortelmans, K. (1992). Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, 2-141.
15. Simmon, V., Kauhanen, K. und Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges und F. Sobels (Hrsg.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.
16. Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. und Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, 421-441.

17. Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. und Sugimura, T. (1979). Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res.*, 39, 3780-3782.
18. Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. und Ames, B.N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4961-4965.
19. Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J. und Gatehouse, D.G. (1990). Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains. *Mutagenesis*, 5, 285-291.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. und Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: "In Vitro metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Hrsg. F.J. de Serres et al. Elsevier, Nordholland, 85-88.
21. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. und Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. und Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88 343-350.
23. Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. und Zeiger, E. (1987). Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity. *Mutation Res.* 189, 83-91.
24. Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. und Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Hrsg. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, 28-65.



## B. 15

### GENMUTATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Verschiedene haploide und diploide Stämme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* können zur Ermittlung chemisch induzierter Genmutationen verwendet werden. Die Versuche können sowohl mit oder ohne exogenes metabolisierendes System durchgeführt werden.

Vorwärtsmutationssysteme an haploiden Stämmen, wie die Messung der Mutation von roten, adeninabhängigen Mutanten (*ade-1*, *ade-2*) zu doppelt adeninabhängigen weißen Mutanten und Selektivsysteme, wie die Induktion einer Cycloheximid- und Kanavaninresistenz, werden verwendet.

Bei dem am besten validierten Rückmutationssystem wird der haploide Stamm XV 185-14C verwendet. Er weist die „ochre“-Nonsense-Mutationen *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* und *trp 5-48*, die durch Basenaustauschmutagen, die ortsspezifische Mutationen oder „ochre“-Suppressor-Mutationen induzieren, reversibel sind. XV 185-14C weist außerdem den Marker *his 1-7*, eine Missense-Mutation, die hauptsächlich durch Mutationen an einem zweiten Genort reversibel ist, sowie den Marker *hom 3-10* auf, der durch Rasterschubmutagen reversibel ist.

Der einzige gut validierte Stamm ist D<sub>7</sub>, der für *ilv 1-92* homozygot ist.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### Vorbereitung

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- oder Bezugssubstanzen sind unmittelbar vor der Prüfung in einem geeigneten Lösungsmittel zu lösen. Bei wasserunlöslichen organischen Verbindungen sind organische Lösungsmittel wie Ethanol, Aceton und Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verwenden, wobei die Konzentration 2% v/v nicht überschreiten darf. Die Endkonzentration des Lösungsmittels soll die Überlebensrate und die Wachstumseigenschaften der Zellen nicht signifikant verändern.

###### Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit den Prüfsubstanzen sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen.

Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion aus Lebern von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien vorbehandelt wurden. Auch andere Arten, Gewebe, post-mitochondriale Fraktionen oder Verfahren können sich für die Stoffwechselaktivierung eignen.

#### *Versuchsbedingungen*

#### **Versuchsstämme**

In Genmutationsuntersuchungen werden am häufigsten der haploide Stamm XV 185-14 C und der diploide Stamm D<sub>7</sub> verwendet. Auch andere Stämme können sich eignen.

#### **Medien**

Zur Bestimmung der Überlebensrate und Mutantenzahl sind geeignete Kulturmedien zu verwenden.

#### **Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen**

Positivkontrollen, unbehandelte und Lösungsmittelkontrollen sind gleichzeitig anzulegen. Für jeden spezifischen Mutationsendpunkt sind geeignete Positivkontrollsubstanzen zu verwenden.

#### **Konzentrationen**

Es sind mindestens fünf deutlich unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Bei toxischen Substanzen sollte die höchste Konzentration die Überlebensrate nicht unter 5 bis 10% senken. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

#### **Inkubationsbedingungen**

Die Platten werden für 4–7 Tage bei 28 bis 30° C im Dunkeln inkubiert.

#### **Häufigkeiten von Spontanmutationen**

Es sind Subkulturen zu verwenden, in denen sich die Spontanmutationshäufigkeiten im üblichen Rahmen bewegen.

#### **Anzahl der Platten**

Mindestens 3 Platten pro Konzentration sind für den Nachweis prototropher Zellen, die durch Genmutation erzeugt werden, und zur Ermittlung der Überlebensrate anzulegen. Bei Versuchen, die Marker wie *hom* 3-10 mit einer geringen Mutationsrate verwenden, ist die Anzahl gleich behandelter Platten zu erhöhen, um statistisch relevante Daten zu erhalten.

#### *Versuchsdurchführung*

Die Behandlung von *S. cerevisiae*-Stämmen wird im allgemeinen mit einem Flüssigtest unter Verwendung von stationären oder wachsenden Zellen durchgeführt. Das Ausgangsexperiment sollte mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. 1 bis 5 mal 10<sup>7</sup> Zellen /ml werden bis zu 18 Stunden bei 28 bis 37 °C gegenüber der Prüfsubstanz unter Schütteln exponiert. Während der Behandlung wird eine angemessene Menge des exogenen metabolisierenden Systems beigefügt. Nach der Behandlung werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und auf einem geeigneten Kulturmedium ausgesät. Nach der Inkubation wird die Überlebensrate und die Genmutationsinduktion auf den Platten quantitativ erfaßt.

Sind die Befunde des ersten Experiments negativ, so ist ein weiterer Versuch durchzuführen mit Zellen, die sich in der stationären Phase befinden. Sind die Befunde des ersten Experiments positiv, so ist dies durch einen geeigneten unabhängigen Versuch zu bestätigen.

2.

#### **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Anzugeben sind die Anzahl der gezählten Konidien, die Anzahl der Mutanten, die Überlebensrate und die Mutantenhäufigkeit. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen. Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Methoden erfolgen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendeter Stamm;
- Versuchsbedingungen: Zellen der stationären Phase oder wachsende Zellen, Medienzusammensetzung, Inkubationstemperatur und -dauer, Stoffwechselaktivierungssysteme;
- Behandlungsbedingungen: Konzentrationen, Behandlungsverfahren und -dauer, Behandlungstemperatur, Positiv- und Negativkontrollen;
- Anzahl der gezählten Kolonien, Anzahl der Mutanten, Überlebensrate und Mutantenhäufigkeit, ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung, statistische Auswertung der Daten;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## B. 16

### MITOTISCHE REKOMBINATION — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Bei *Saccharomyces cerevisiae* läßt sich mitotische Rekombination zwischen verschiedenen Genen (oder allgemeiner zwischen einem Gen und dem Zentromer) und innerhalb eines Gens feststellen. Im ersten genannten Fall wird sie mitotisches Crossing-over genannt und erzeugt Reziprokprodukte, während sie im letzteren Fall meistens keine reziproken Ergebnisse hat und als Genkonversion bezeichnet wird. Das Crossing-over wird anhand der Bildung rezessiver homozygoter Kolonien oder Sektoren in einem heterozygoten Stamm bestimmt, die Genkonversion hingegen anhand der Bildung prototropher Revertanten mit zwei verschiedenen defekten Allelen des gleichen Gens in einem auxotrophen heteroallelen Stamm. Die am häufigsten zur Ermittlung der mitotischen Genkonversion verwendeten Stämme sind D<sub>4</sub> (heteroallel für *ade 2* und *trp 5*), BZ<sub>34</sub> (heteroallel für *arg 4*), D<sub>7</sub> (heteroallel für *trp 5*) und JD1 (heteroallel für *his 4* und *trp 5*). Mitotisches Crossing-over, das rote („red“) und rosafarbene („pink“) homozygote Sektoren erzeugt, läßt sich mit D<sub>3</sub> oder mit D<sub>7</sub> (der auch zur Messung von mitotischer oder Genkonversion und von Rückmutationen an *ilv 1-92* dient) ermitteln. Beide Stämme sind heteroallel in bezug für einander komplementierende Allele von *ade 2*.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- und Bezugssubstanzen sind unmittelbar vor der Prüfung in einem geeigneten Lösungsmittel zu lösen. Bei wasserunlöslichen organischen Verbindungen sind organische Lösungsmittel wie Ethanol, Aceton oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zu verwenden, wobei die Konzentration 2% v/v nicht überschreiten darf. Die Endkonzentration des Lösungsmittels soll die Überlebensrate und die Wachstumseigenschaften der Zellen nicht signifikant verändern.

###### Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit den Prüfsubstanzen soll sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion aus Lebern von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien vorbehandelt wurden. Auch andere Arten, Gewebe, post-mitochondriale Fraktionen oder Verfahren können sich für die Stoffwechselaktivierung eignen.

###### *Prüfbedingungen*

###### Versuchsstämme

Die am häufigsten verwendeten Stämme sind die diploiden Stämme D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>7</sub> und JD1. Auch andere Stämme können sich eignen.

## Medien

Zur Bestimmung der Überlebensrate und der Häufigkeit der mitotischen Rekombination werden geeignete Kulturmedien verwendet.

## Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Positivkontrollen, unbehandelte und Lösungsmittelkontrollen sind gleichzeitig durchzuführen. Für jeden spezifischen Rekombinationsendpunkt sind geeignete Bezugssubstanzen zu verwenden.

## Konzentrationen

Mindestens fünf deutlich unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz sind zu verwenden. Unter anderem sind Zytotoxizität und Löslichkeit zu berücksichtigen. Die niedrigste Konzentration darf sich in keiner Weise auf die Überlebensrate der Zellen auswirken. Bei toxischen Substanzen sollte die höchste geprüfte Konzentration die Überlebensrate nicht unter 5 bis 10 % senken. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

Zellen können entweder in der stationären oder in der Wachstumsphase bis zu 18 Stunden gegenüber der Prüfsubstanz exponiert werden. Wird für einen längeren Zeitraum exponiert, sind die Kulturen mikroskopisch auf Sporenbildung zu untersuchen, da deren Vorhandensein den Versuch invalidiert.

## Inkubationsbedingungen

Die Platten werden im Dunkeln vier bis sieben Tage lang bei 28 bis 30 °C inkubiert. Die zur Bestimmung der durch mitotisches Crossing-over erzeugten roten („red“) und rosafarbenen („pink“) homozygoten Sektoren verwendeten Schalen sind weitere ein bis zwei Tage gekühlt (4 °C) zu halten, um die Entwicklung der entsprechenden pigmentierten Kolonien zu ermöglichen; erst dann sollte die quantitative Erfassung erfolgen.

## Häufigkeit von Spontanmutationen

Es sind Subkulturen zu verwenden, bei denen sich die Häufigkeit spontaner mitotischer Rekombinationen im üblichen Rahmen bewegen.

## Anzahl der Platten

Mindestens 3 Platten pro Konzentration sind für den Nachweis prototropher Zellen, die durch mitotische Genkonversion erzeugt wurden, und zur Bestimmung der Überlebensrate anzulegen. Bei der Bestimmung der durch mitotisches Crossing-over erzeugten rezessiven Homozygotie ist die Anzahl an Platten zu erhöhen, um eine geeignete Anzahl an Kolonien zu erhalten.

## Versuchsdurchführung

Die Behandlung *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgt gewöhnlich in einem Flüssigtest unter Verwendung von stationären oder wachsenden Zellen. Das Ausgangsexperiment sollte mit wachsenden Zellen durchgeführt werden. 1 bis 5 mal 10<sup>7</sup> Zellen/ml werden bis zu 18 Stunden bei 28 bis 37 °C gegenüber der Prüfsubstanz unter Schütteln exponiert. Während der Behandlung wird eine angemessene Menge des exogenen metabolisierenden Systems zugegeben. Nach der Behandlung werden die Zellen zentrifugiert, gewaschen und auf ein geeignetes Kulturmedium ausgesät. Nach der Inkubation wird die Überlebensrate und die Induktion mitotischer Rekombinationen quantitativ erfaßt.

Sind die Befunde des ersten Experiments negativ, so ist ein weiterer Versuch durchzuführen mit Zellen, die sich in der stationären Phase befinden. Sind die Befunde des ersten Experiments positiv, so ist dies durch einen geeigneten unabhängigen Versuch zu bestätigen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der gezählten Konidien, der Anzahl der Rekombinationen, die Überlebensrate und die Rekombinationshäufigkeit darzustellen.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendeter Stamm;
- Versuchsbedingungen: Zellen der stationären Phase oder wachsende Zellen, Medienzusammensetzung, Inkubationstemperatur und -dauer, Stoffwechselaktivierungssystem;
- Behandlungsbedingungen: Konzentrationen, Behandlungsverfahren und -dauer, Behandlungstemperatur, Positiv- und Negativkontrollen;
- Anzahl der gezählten Kolonien, Anzahl der Rekombinanten, Überlebensrate und Rekombinationshäufigkeit, ggf. Dosis-Wirkungsbeziehung, statistische Auswertung der Daten;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## B. 17. MUTAGENITÄT – *IN VITRO*-GENMUTATIONSTEST AN SÄUGETIERZELLEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

#### 1.1 EINLEITUNG

Der *In-Vitro*-Genmutationstest an Säugetierzellen kann zum Nachweis von chemisch induzierten Genmutationen herangezogen werden. Zu den geeigneten Zelllinien gehören Maus-Lymphomazellen L5178Y, die Zelllinien CHO, CHO-AS52 und V79 des chinesischen Hamsters und menschliche Lymphoblastoidzellen TK6 (1). Mit diesen Zelllinien werden in den gebräuchlichsten Systemen Mutationen an den Loci für Thymidinkinase (TK) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) sowie für ein Transgen von Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT) nachgewiesen. Durch den TK-, HPRT- und XPRT-Mutationstest lassen sich unterschiedliche Spektren genetischer Ereignisse ermitteln. Die Autosomenlokation von TK und XPRT ermöglicht ggf. den Nachweis genetischer Ereignisse (z.B. großer Deletionen), die nicht am HPRT-Locus auf den X-Chromosomen feststellbar sind (2)(3)(4)(5)(6).

Beim *In-vitro*-Genmutationstest an Säugetierzellen können Kulturen von etablierten Zelllinien oder Zellstämmen zum Einsatz kommen. Die verwendeten Zellen werden unter dem Gesichtspunkt der Wachstumsfähigkeit in Kultur und der Stabilität der Spontanmutationshäufigkeit ausgewählt.

*In vitro* durchgeführte Versuche erfordern in der Regel den Zusatz eines exogenen Fremdstoff-Metabolisierungssystems. Mit diesem System lassen sich aber die *In-vivo*-Bedingungen bei Säugetieren nicht gänzlich nachvollziehen. Es sind unbedingt Bedingungen zu vermeiden, bei denen positive Ergebnisse auftreten, die nicht die intrinsische Mutagenität widerspiegeln und möglicherweise aus Veränderungen des pH-Wertes bzw. der Osmolalität oder hochgradiger Zytotoxizität herrühren (7).

Dieser Test dient zum Nachweis möglicher Mutagene und Karzinogene in Säugetierzellen. Viele chemische Verbindungen, bei denen der Test positiv ausfällt, haben eine karzinogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation zwischen Test und Karzinogenität. Die Korrelation ist von der chemischen Klasse abhängig, und es gibt zunehmende Anzeichen dafür, daß bestimmte Karzinogene durch diesen Test nicht nachweisbar sind, da ihre Wirkung anscheinend auf anderen, nicht gentoxischen Mechanismen oder in Bakterienzellen fehlenden Mechanismen beruht (6).

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2 DEFINITIONEN

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

**Basenpaaraustauschmutagene:** Agenzien, die den Austausch eines oder mehrerer Basenpaare in der DNA verursachen.

**Rasterschubmutagene:** Agenzien, die die Addition oder Deletion von einem oder mehreren Basenpaaren im DNA-Molekül verursachen.

**Expressionszeit des Phänotyps:** Zeitraum, in dem aus neumutierten Zellen unveränderte Genprodukte abgebaut werden.

**Mutantenhäufigkeit:** Verhältnis der Anzahl der mutierten Zellen zur Anzahl der lebensfähigen Zellen.

**Relative Gesamtwachstumsrate:** Anstieg der Zellpopulation im Zeitverlauf gegenüber einer Kontrollzellpopulation; ermittelt durch Multiplikation der Suspensionswachstumsrate im Verhältnis zur Negativkontrolle mit der Klonierungseffizienz im Verhältnis zur Negativkontrolle.

**Relative Suspensionswachstumsrate:** Anstieg der Zellpopulation während der Expressionszeit gegenüber der Negativkontrolle.

**Lebensfähigkeit:** Klonierungseffizienz der behandelten Zellen zum Zeitpunkt der Ausplattierung unter selektiven Bedingungen nach der Expressionszeit.

**Überlebensrate:** Klonierungseffizienz der behandelten Zellen beim Ausplattieren nach Ablauf der Behandlungszeit; die Überlebensrate wird gewöhnlich in Relation zur Überlebensrate der Kontrollzellpopulation angegeben.

### 1.3

#### PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Zellen, die infolge der Mutation  $TK^{+/-}$  ->  $TK^{-/-}$  keine Thymidinkinase (TK) enthalten, sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung des Pyrimidinanalogs Trifluorthymidin (TFT) resistent. Bei Anwesenheit von Thymidinkinase sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TFT, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. So können die Mutantenzellen bei Anwesenheit von TFT proliferieren, während die normalen Zellen, die Thymidinkinase enthalten, nicht dazu in der Lage sind. In ähnlicher Weise werden HPRT- oder XPRT-defiziente Zellen durch Resistenz gegenüber 6-Thioguanin (TG) oder 8-Azaguanin (AG) selektiert. Die Eigenschaften der Prüfsubstanz sind sorgfältig zu beachten, wenn bei einem Genmutationstest an Säugetierzellen ein mit dem selektierenden Agens verwandtes Basenanalogs bzw. eine damit verwandte Verbindung geprüft wird. Beispielsweise sollte jedem Verdacht auf selektive Toxizität der Prüfsubstanz bei mutierenden und nichtmutierenden Zellen nachgegangen werden. Bei der Prüfung von Chemikalien, die strukturell mit dem selektierenden Agens verwandt sind, muß die Leistungsfähigkeit des Selektivsystems bzw. des selektierenden Agens bestätigt werden (8).

Zellen in Suspensions- oder Monoschichtkultur werden über einen angemessenen Zeitraum mit und ohne Metabolisierungssystem mit der Prüfsubstanz behandelt und subkultiviert, um die Zytotoxizität zu bestimmen und vor der Mutantenselektion die Expression des Phänotyps zu ermöglichen (9)(10)(11)(12)(13). Die Zytotoxizität wird gewöhnlich durch Bestimmung der relativen Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder des relativen Gesamtwachstums der Kulturen nach Ablauf der Behandlungszeit ermittelt. Die behandelten Kulturen werden für einen ausreichenden Zeitraum, der für den jeweils gewählten Locus und Zelltyp charakteristisch ist, in einem Wachstumsmedium gehalten, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der induzierten Mutationen zu ermöglichen. Die Mutantenhäufigkeit wird bestimmt, indem man eine bekannte Anzahl von Zellen auf ein Medium mit dem selektierenden Agens zur Bestimmung der Mutantenzahl und auf ein Medium ohne selektierendes Agens zur Bestimmung der Klonierungseffizienz (Lebensfähigkeit) aufgeimpft. Nach einer geeigneten Inkubationszeit werden die Kolonien gezählt. Die Mutantenhäufigkeit wird aus der Anzahl der Mutantenkolonien im selektiven Medium und der Anzahl der Kolonien im nichtselektiven Medium berechnet.



## 1.4 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

### 1.4.1 Vorbereitungen

#### 1.4.1.1 *Zellen*

Für diesen Versuch stehen eine Reihe von Zelltypen zur Verfügung. Dazu gehören Subklone von L5178Y, CHO-, CHO-AS52-, V79- oder TK6-Zellen. Die bei diesem Test verwendeten Zelltypen sollten nachweislich eine Empfindlichkeit für chemische Mutagene, eine hohe Klonierungseffizienz und eine geringe Spontanmutationshäufigkeit aufweisen. Die Zellen sind auf Mycoplasmaverunreinigung zu überprüfen und bei Verunreinigung nicht heranzuziehen.

. Der Test sollte so angelegt werden, dass er ausreichende Sensitivität hat. Die Anzahl der Zellen, die verwendeten Kulturen und Konzentrationen der Prüfsubstanz sollten den vorgegebenen Parametern entsprechen (14). Die Mindestzahl der lebensfähigen Zellen, die die Behandlung überstehen und im jeweiligen Stadium der Prüfung verwendet werden, sollte auf der Spontanmutationshäufigkeit beruhen. Als allgemeine Faustregel gilt die Verwendung einer Anzahl von Zellen, die mindestens dem Zehnfachen des reziproken Wertes der Spontanmutationshäufigkeit entspricht. Es wird aber empfohlen, mindestens  $10^6$  Zellen zu verwenden. Es sollten angemessene historische Daten zum verwendeten Zellsystem vorhanden sein, um die durchgängige Aussagefähigkeit des Tests zu belegen.

#### 1.4.1.2 *Kulturmedien und Inkubationsbedingungen*

Zur Kultivierung sind geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen (Kulturgefäße, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu verwenden. Die Medien sind entsprechend dem beim Test verwendeten Selektivsystem und Zelltyp auszuwählen. Vor allem ist für Inkubationsbedingungen zu sorgen, die ein optimales Zellwachstum während der Expressionszeit und die Fähigkeit der mutierenden und nichtmutierenden Zellen zur Koloniebildung gewährleisten.

#### 1.4.1.3 *Vorbereitung der Kulturen*

Die Zellen werden aus Stammkulturen gewonnen, auf das Kulturmedium aufgeimpft und bei 37°C inkubiert. Vor der Verwendung bei diesem Test sind die Kulturen ggf. von bereits vorhandenen Mutantenzellen zu reinigen.

#### 1.4.1.4 *Stoffwechselaktivierung*

Die Behandlung der Bakterien mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Metabolisierungssystems erfolgen. Das am häufigsten verwendete System ist eine durch Ko-Faktoren ergänzte post-mitochondriale Fraktion (S9) aus der Leber von Nagetieren, die mit enzyminduzierenden Agenzien wie Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) oder einem Gemisch aus Phenobarbiton und  $\beta$ -Naphthoflavon (19)(20) vorbehandelt wurden.

Im Endmedium wird die post-mitochondriale Fraktion in der Regel in Konzentrationen von 1 bis 10 % v/v verwendet. Wahl und Bedingungen des Metabolisierungssystems können von der geprüften chemischen Klasse abhängig sein. In bestimmten Fällen ist es ggf. zweckmäßig, mehr als eine Konzentration der post-mitochondrialen Fraktion zu verwenden.

Eine Reihe von Entwicklungen, darunter die Herstellung gentechnisch veränderter Zelllinien zur Expression spezifischer Aktivierungsenzyme, eröffnen vielleicht die Möglichkeit für eine endogene Aktivierung. Die Wahl der verwendeten Zelllinien sollte wissenschaftlich begründet sein (z.B. durch die Relevanz des Isoenzym Cytochrom P450 für den Stoffwechsel der Prüfsubstanz).

#### 1.4.1.5 *Prüfsubstanz/Zubereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Zellbehandlung in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können den Versuchssystemen vor der Behandlung direkt beigegeben und/oder verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen.

#### 1.4.2 **Prüfbedingungen**

##### 1.4.2.1 *Lösungsmittel/Vehikel*

Die Lösungsmittel/Vehikel sollten nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen, und sie sollten mit dem Überleben der Zellen und der S9-Aktivität kompatibel sein. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Daten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen. Bei der Prüfung wasserinstabiler Substanzen sollten die verwendeten organischen Lösungsmittel frei von Wasser sein. Das Wasser läßt sich durch Zusatz eines Molekularsiebs entfernen.

##### 1.4.2.2 *Expositionskonzentrationen*

Zu den Kriterien, die bei der Bestimmung der höchsten Konzentration zu berücksichtigen sind, zählen die Zytotoxizität, die Löslichkeit im Versuchssystem und die Veränderungen des pH-Wertes oder der Osmolalität.

Die Zytotoxizität sollte im Hauptversuch mit und ohne Stoffwechselaktivierung unter Verwendung eines geeigneten Indikators für Zellintegrität und -wachstum wie relative Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder relatives Gesamtwachstum bestimmt werden. Es ist möglicherweise sinnvoll, die Zytotoxizität und Löslichkeit in einem Vorversuch zu bestimmen.

Es sind mindestens vier analysierbare Konzentrationen zu verwenden. Wenn Zytotoxizität auftritt, sollten diese Konzentrationen den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Im Normalfall bedeutet dies, daß sich die Konzentrationen maximal um einen Faktor zwischen 2 und  $\sqrt{10}$  unterscheiden. Beruht die höchste Konzentration auf der Zytotoxizität, sollte sie eine relative Überlebensrate (relative Klonierungseffizienz) oder relative Gesamtwachstumsrate von ca. 10 bis 20 % (aber mindestens 10 %) ergeben. Bei relativ nichtzytotoxischen Substanzen sollte die maximale Prüfkonzentration 5 mg/ml, 5 µl/ml oder 0.01 M betragen, je nachdem, welcher Wert am niedrigsten ist.

Relativ unlösliche Substanzen sind unter Kulturbedingungen bis zur Löslichkeitsgrenze und darüber hinaus zu testen. Eine etwaige Unlöslichkeit ist im Endmedium zu bestimmen, dem die Zellen ausgesetzt werden. Möglicherweise ist es sinnvoll, die Löslichkeit zum Anfang und Abschluß der Behandlung zu bewerten, da sich die Löslichkeit im Versuchssystem während der Exposition aufgrund des Vorhandenseins von Zellen, S9, Serum usw. verändern kann. Die Unlöslichkeit ist mit dem bloßen Auge erkennbar. Die Ausfällung sollte die Bewertung nicht beeinträchtigen.

##### 1.4.2.3 *Kontrollen*

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel- oder Vehikel-)Kontrollen mit oder ohne Zusatz eines Stoffwechselaktivierungssystems anzulegen. Bei Stoffwechselaktivierung sollte die Positivkontrollsubstanz jene Substanz sein, die zur mutagenen Reaktion eine Aktivierung benötigt.

Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Fragen:

Stoffwechsel-aktivierungs-status	Ort	Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
ohne exogene Stoffwechselaktivierung	HPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0	200-536-7
		Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9	212-072-2
	TK (kleine und große Kolonien)	Methylmethansulfonat	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Ethylmethansulfonat	62-50-0
			Ethylnitrosoharnstoff	759-73-9
	mit exogener Stoffwechselaktivierung	HPRT	3-Methylcholanthren	56-49-5
N-Nitrosodimethylamin			62-75-9	200-549-8
7,12-Dimethylbenzanthracen			57-97-6	200-359-5
TK (kleine und große Kolonien)		Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
		Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
		Benzo[a]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-Methylcholanthren	56-49-5	200-276-5
XPRT			N-Nitrosodimethylamin (für hohe Konzentrationen von S-9)	62-75-9
	Benzo[a]pyren		50-32-8	200-028-5

Es kommen auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen in Betracht. Wenn z.B. ein Labor über historische Datenbestände zu 5-Bromo 2'-deoxyuridin [CAS-Nummer 59-14-3, EINECS-Nummer 200-415-9] verfügt, könnte auch diese Bezugssubstanz zum Einsatz kommen. Gegebenenfalls sollten Positivkontrollen herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehören wie der Prüfstoff.

Es sind Negativkontrollen zu verwenden, bei denen das Behandlungsmedium lediglich Lösungsmittel oder Vehikel enthält und die auf die gleiche Weise wie die Behandlungskulturen behandelt werden. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrollen verwendet werden, wenn nicht historische Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

### 1.4.3 **Verfahren**

#### 1.4.3.1 *Behandlung mit der Prüfsubstanz*

Proliferierende Zellen werden mit und ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt. Die Exposition sollte über einen geeigneten Zeitraum (gewöhnlich 3 bis 6 Stunden) erfolgen. Die Expositionszeit kann sich über einen oder mehrere Zellzyklen erstrecken.

Es sollten für jede geprüfte Konzentration behandelte Zweifach- oder Einfachkulturen herangezogen werden. Bei Einfachkulturen ist die Anzahl der Konzentrationen zu erhöhen, damit eine ausreichende Anzahl von Kulturen zur Analyse vorliegt (d.h. mindestens 8 analysierfähige Konzentrationen). Es sind zweifache Negativ- (Lösungsmittel-)Kontrollkulturen zu verwenden.

Gasförmige oder flüchtige Substanzen sind mit Hilfe geeigneter Methoden zu prüfen, z.B. in hermetisch verschlossenen Kulturgefäßen (21)(22).

#### 1.4.3.2 *Bestimmung der Überlebensrate, der Lebensfähigkeit und der Mutantenhäufigkeit*

Am Ende der Expositionszeit werden die Zellen gewaschen und kultiviert, um die Überlebensrate zu bestimmen und die Expression des Mutantphenotyps zu ermöglichen. Die Bestimmung der Zytotoxizität durch Ermittlung der relativen Klonierungseffizienz (Überlebensrate) oder des relativen Gesamtwachstums der Kulturen erfolgt in der Regel nach Ablauf der Behandlungszeit.

Jeder Locus hat eine bestimmte Mindestzeit, um eine annähernd optimale phänotypische Expression der neu induzierten Mutanten zu ermöglichen (HPRT und XPRT benötigen mindestens 6 bis 8 Tage, TK mindestens 2 Tage). Die Zellen werden in Medien mit und ohne selektierende Agenzien kultiviert, um die Mutantenzahl bzw. die Klonierungseffizienz zu bestimmen. Die Bestimmung der Lebensfähigkeit (zur Berechnung der Mutantenhäufigkeit) erfolgt nach dem Ablauf der Expressionszeit durch Ausplattieren in einem nicht selektierenden Medium.

Wenn die Prüfsubstanz im L5178Y TK<sup>+/−</sup>-Test einen positiven Befund ergibt, sollte zumindest bei einer der Prüfkulturen (der höchsten positiven Konzentration) und bei den Negativ- und Positivkontrollen eine Größeneinteilung der Kolonien erfolgen. Ergibt die Prüfsubstanz beim L5178Y TK<sup>+/−</sup>-Test einen negativen Befund, so ist eine Koloniegrößeneinstufung bei den Negativ- und Positivkontrollen durchzuführen. Eine Koloniegrößeneinstufung ist ggf. auch bei Studien mit TK6TK<sup>+/−</sup> vorzunehmen.

## 2. DATEN

### 2.1 AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Anzugeben sind die Zytotoxizität, die Lebensfähigkeit, die Koloniezahlen und die Mutantenhäufigkeit für die Prüf- sowie Kontrollkulturen. Ergibt der L5178Y TK<sup>+/+</sup>-Test einen positiven Befund, werden die Kolonien bei mindestens einer Konzentration der Prüfsubstanz (der höchsten positiven Konzentration) sowie bei den Negativ- und Positivkontrollen nach dem Kriterium kleine oder große Kolonie ausgewertet. Die molekulare und zellgenetische Beschaffenheit von Mutanten mit Bildung grosser und Mutanten mit Bildung kleiner Kolonien ist gründlich erforscht (23)(24). Beim TK<sup>+/+</sup>-Test werden die Kolonien nach dem Kriterium normal wachsende (große) oder langsam wachsende (kleine) Kolonie eingestuft (25). Mutantenzellen mit einer erheblichen genetischen Schädigung weisen eine längere Generationszeit auf und bilden daher kleine Kolonien. Die Schädigung kann vom Verlust eines kompletten Gens bis zu karyotypisch erkennbaren Chromosomenaberrationen reichen. Mutanten mit der Bildung kleiner Kolonien treten vor allem bei Chemikalien auf, die starke Chromosomenaberrationen hervorrufen (26). Weniger stark betroffene Mutantenzellen wachsen in ähnlichem Tempo wie die Elternzellen und bilden große Kolonien.

Es ist die Überlebensrate (relative Klonierungseffizienz) oder das relative Gesamtwachstum anzugeben. Unter der Mutantenhäufigkeit ist der zahlenmäßige Anteil der Mutantenzellen an den überlebenden Zellen zu verstehen.

Es sind die Daten für die einzelnen Kulturen zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden.

Bei einer eindeutigen positiven Reaktion ist eine Verifizierung nicht erforderlich. Nicht eindeutige Ergebnisse sind durch weitere Prüfungen abzuklären, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen. Negative Ergebnisse sind durch Einzelfallprüfung zu bestätigen. In jenen Fällen, in denen eine Bestätigung negativer Ergebnisse nicht für notwendig erachtet wird, ist dies zu begründen. Bei Folgeversuchen sollte die Abänderung der Studienparameter zur Erweiterung des Umfangs der bewerteten Bedingungen in Betracht gezogen werden. Zu den Studienparametern, die für eine Abänderung in Frage kommen, gehören die Abstände der Konzentrationen und der Stoffwechselaktivierungsstatus.

### 2.2 BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z.B. eine konzentrationsbezogene Zunahme und/oder eine reproduzierbare Zunahme der Mutationsrate. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen. Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Eine Prüfsubstanz, bei denen die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem System als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Ergebnisse aus dem In-vitro-Genmutationstest an Säugetierzellen deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz in den verwendeten kultivierten Säugetierzellen Genmutationen hervorruft. Eine reproduzierbare positive Relation zwischen Konzentration und Wirkung ist sehr bedeutsam. Negative Ergebnisse sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen in den verwendeten kultivierten Säugetierzellen keine Genmutationen auslöst.

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten :

##### Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels/Lösungsmittels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

##### Zellen:

- Typ und Herkunft der Zellen;
- Anzahl der Zellkulturen;
- ggf. Passagenanzahl;
- ggf. zum Erhalt der Zellkultur verwendete Verfahren;
- Nichtvorhandensein von Mycoplasma.

##### Prüfbedingungen:

- Begründung für die Auswahl der Konzentrationen und die Anzahl der Kulturen, darunter z.B. Angaben zur Zytotoxizität und Löslichkeitsgrenze, falls vorhanden;
- Medienzusammensetzung, CO<sub>2</sub>-Konzentration;
- Konzentration der Prüfsubstanz;
- Volumen des Vehikels und der beigegebenen Prüfsubstanz;
- Inkubationstemperatur;
- Inkubationszeit;
- Behandlungsdauer;
- Zelldichte während der Behandlung;
- Art und Zusammensetzung des Stoffwechselaktivierungssystems einschließlich Eignungskriterien;
- Positiv- und Negativkontrollen;
- Dauer der Expressionszeit (ggf. einschließlich Anzahl der überimpften Zellen, Subkulturen und Medienwechsel);
- selektierende Agenzien;
- Kriterien zur Einstufung der Tests als positiv, negativ oder nicht eindeutig;
- Methoden zur Zählung der lebensfähigen und mutierten Zellen;
- Angaben zur Berücksichtigung der Kolonien nach Größe und Typ (ggf. einschließlich Kriterien für „kleine“ und „große“ Kolonien).

Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Ausfällungszeichen;
- Angaben zum pH-Wert und zur Osmolalität des Behandlungsmediums, falls ermittelt;
- Koloniegröße, falls bewertet, zumindest für Negativ- und Positivkontrollen;
- ggf. Voraussetzungen des Labors zur Bestimmung von Mutanten mit geringer Koloniebildung durch das L5178Y TK<sup>+/+</sup>-System;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit Bereichen, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Mutantenhäufigkeit.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

1. Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. und Tindall, K.R. (Hrsg.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
2. Chu, E.H.Y. und Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
3. Liber, H.L. und Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467-485.
4. Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. und Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394-403.
5. Aaron, C.S. und Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.
6. Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. und Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.
7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. und Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.
8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. und Mavourmin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 225-251.
9. Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. und Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 196, 17-36.
10. Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, J.P., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. und Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.
11. Liber, H.L., Yandell, D.W. und Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.
12. Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. und Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.
13. Turner, N.T., Batson, A.G. und Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK<sup>+/+</sup> - TK<sup>+/+</sup> Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (Hrsg.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, 239-268.
14. Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. und Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Hrsg., Cambridge University Press, 66-101.
15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. und Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.



16. Ames, B.N., McCann, J. und Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
17. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. und Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK<sup>+/+</sup> Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61-108.
18. Maron, D.M. und Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
19. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. und Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. und Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. und Philpot, R.M. (Hrsg.), Elsevier, Nordholland, 85-88.
21. Krahn, D.F., Barsky, F.C. und McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (Hrsg.). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, 91-103.
22. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. und Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
23. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. und Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51-55.
24. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. und Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT<sup>r</sup>) Mutants of L5178Y/TK<sup>+/+</sup> Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161-174.
25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. und Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, 89-102.
26. Moore, M.M. und Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK<sup>+/+</sup>-3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609-614.

## B. 18

### DNS-SCHÄDIGUNG UND -REPARATUR — UNPLANMÄSSIGE DNS-SYNTHESE (UDS) — SÄUGETIERZELLEN — IN VITRO

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Mit dem Test zur unplanmäßigen DNS-Synthese (UDS)-Test wird die DNS-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen des Abschnittes eines DNS-Stranges gemessen, in dem sich die durch chemische und physikalische Agenzien induzierte Schädigung befindet. Der UDS-Test eignet sich zur Ermittlung der „long patch“-Reparatur. Die „short patch“-Reparatur oder Insertion einzelner Nukleotidbasen läßt sich damit nicht oder nur mit einem sehr geringen Empfindlichkeitsgrad feststellen. Der Test beruht auf dem Einbau von tritiummarkiertem Thymidin ( $^3\text{H-TdR}$ ) in die DNS von Säugetierzellen, die sich außerhalb der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die  $^3\text{H-TdR}$ -Aufnahme läßt sich durch Autoradiographie oder eine Flüssigkeitsszintillationszählung (LSC = Liquid Scintillation Counting) der DNS behandelter Zellen bestimmen. Säugetierzellen in Kultur werden, sofern es sich nicht um primäre Rattenhepatozyten handelt, mit der Prüfsubstanz mit oder ohne Zusatz eines exogenen Stoffwechselaktivierungssystems behandelt. Die UDS läßt sich auch in *in vivo*-Systemen messen.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### Vorbereitung

Die Prüfsubstanzen und die Kontroll- oder Bezugssubstanzen sollten in Medium oder in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert werden. Die endgültige Lösungsmittelkonzentration darf die Überlebensrate der Zellen nicht beeinträchtigen.

In diesem Versuch können primäre Kulturen von Rattenhepatozyten, menschlichen Lymphozyten oder etablierten Zelllinien (z. B. menschliche diploide Fibroblasten) verwendet werden.

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungssystems erfolgen.

###### Versuchsbedingungen

###### Anzahl der Kulturen

Für jeden experimentellen Punkt werden mindestens zwei Zellkulturen für die Autoradiographie verwendet und mindestens sechs Zellkulturen (wenn es wissenschaftlich begründbar ist, können weniger verwendet werden) für das LSC-Verfahren.

###### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Für jeden Versuch sind gleichzeitig Positiv- und (unbehandelte und/oder Lösungsmittel) Negativkontrollen mit oder ohne Zusatz eines Metabolisierungssystems anzulegen.

Beispiele für die Positivkontrollen für den Rattenhepatozytenversuch sind: 7,12-Dimethylbenzanthracen (7,12-DMBA) oder 2-Azetylaminofluoren (2-AAF). Werden etablierte Zelllinien verwendet, kann 4-Nitochinolin-N-oxid (4-NAO) als Positivkontrolle für Autoradiographie- und LSC-Versuche ohne Stoffwechselaktivierung dienen. Ein Beispiel für eine Positivkontrolle bei Verwendung von Stoffwechselaktivierungssystemen ist N-Dimethylnitrosamin.

#### Konzentrationen

Es sind mehrere unterschiedliche Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Die höchste Konzentration sollte zytotoxisch wirken. Relativ wasserunlösliche Verbindungen sind bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Konzentration von Fall zu Fall festzulegen.

#### Zellen

Die Kulturen sind unter geeigneten Bedingungen (Wachstumsmedien, CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur und Feuchtigkeit) zu halten. Etablierte Zelllinien sind periodisch auf *Mycoplasma*-Verunreinigung zu überprüfen. Weiterhin ist eine periodische Überprüfung der Zellen auf Karyotypstabilität ratsam.

#### Stoffwechselaktivierung

Bei primären Hepatozytenkulturen wird kein exogenes Stoffwechselaktivierungssystem verwendet.

Die Behandlung etablierter Zelllinien und Lymphozyten mit der Prüfsubstanz erfolgt sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten exogenen Stoffwechselaktivierungssystems.

#### Versuchsdurchführung

##### Vorbereitung der Kulturen

Etablierte Zelllinien werden aus Stammkulturen gewonnen (z. B. durch Trypsinierung bzw. Abschütteln), in Kulturgefäße in angemessener Zelldichte überimpft und bei 37 °C inkubiert.

Kurzzeitkulturen von Rattenhepatozyten werden dadurch angelegt, daß man es frisch gewonnenen Hepatozyten ermöglicht, sich in einem geeigneten Medium an die Wachstumsfläche festzuheften.

Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden mit geeigneten Verfahren angelegt.

##### Behandlung der Kulturen mit der Prüfsubstanz

###### Primäre Rattenhepatozyten

Frisch isolierte Rattenhepatozyten werden in einem <sup>3</sup>H-TdR enthaltenden Medium während eines angemessenen Zeitraums mit der Prüfsubstanz behandelt. Nach Ende der Behandlung wird das Medium entfernt, die Zellen werden gewaschen, fixiert und getrocknet. Die Objektträger werden in Autoradiographieemulsion getaucht (alternativ dazu können „stripping“-Filme verwendet werden), „belichtet“, entwickelt, gefärbt und ausgewertet.

###### Etablierte Zelllinien und Lymphozyten

*Autoradiographieverfahren:* Die Zellkulturen werden jeweils während einer angemessenen Zeitdauer mit der Prüfsubstanz behandelt und dann mit <sup>3</sup>H-TdR behandelt. Die Zeiten richten sich nach Art der Substanz, Aktivität des Stoffwechselsystems und Zelltyp. Zur Ermittlung des UDS-Maximums ist <sup>3</sup>H-TdR entweder gleichzeitig mit der Prüfsubstanz oder innerhalb weniger Minuten danach zuzugeben.

Für welches dieser beiden Verfahren man sich entscheidet, hängt von der Möglichkeit einer Interaktion zwischen Prüfsubstanz und <sup>3</sup>H-TdR ab.

Um zwischen UDS und semikonservativer DNS-Replikation zu unterscheiden, kann letztere z. B. durch Verwendung eines argininfreien Mediums, durch geringen Serumgehalt oder Hydroxyharnstoff im Kulturmedium gehemmt werden.

*Messungen der UDS mit dem LSC-Verfahren:* Vor Behandlung mit der Prüfsubstanz sollte der Eintritt der Zellen in die S-Phase wie oben beschrieben blockiert werden. Anschließend sind die Zellen wie bei der Autoradiographie beschrieben mit der Prüfsubstanz zu behandeln. Nach Ende der Inkubationszeit extrahiert man die DNS aus den Zellen und bestimmt den gesamten DNS-Gehalt sowie die <sup>3</sup>H-TdR-Einbaureate.

Bei Verwendung nichtstimulierter menschlicher Lymphozyten erübrigen sich die oben genannten Verfahren zur Hemmung der semikonservativen DNS-Replikation.

## *Analyse*

### **Autoradiographiebestimmung**

Bei der Bestimmung der UDS an Zellen in Kultur werden die S-Phasen-Kerne nicht gezählt. Pro Konzentration sind bei der Zählung mindestens 50 Zellen zu erfassen. Die Objektträger sollten vor der Zählung kodiert werden. Auf jedem Objektträger sind mehrere weit auseinander liegende, nach dem Zufallsprinzip ausgewählte Felder zu zählen. Das Ausmaß der Hintergrund-Markierung im Zytoplasma ist durch Zählung von drei Bereichen von der Größe eines Kerns im Zytoplasma jeder gezählten Zelle zu bestimmen.

### **Bestimmungen mit dem LSC-Verfahren**

Bei Bestimmungen der UDS mit dem LSC-Verfahren ist eine angemessene Anzahl von Kulturen pro Konzentration und in den Kontrollen zu verwenden.

Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

## **2. DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen.

### **2.1. Autoradiographiebestimmungen**

Das Ausmaß des <sup>3</sup>H-TdR-Einbaus im Zytoplasma und die Anzahl der Körner über dem Zellkern sind getrennt zu vermerken.

Zur Beschreibung der Verteilung der <sup>3</sup>H-TdR-Hintergrundmarkierung und der Anzahl der Granula pro Kern können Mittelwert, Medianwert und Modalwert verwendet werden.

### **2.2. Bestimmungen mit dem LSC-Verfahren**

Bei der Bestimmung mit dem LSC-Verfahren ist der <sup>3</sup>H-TdR-Einbau in dpm/μg DNS anzugeben. Zur Beschreibung der Einbauverteilung kann der Mittelwert für dpm/μg DNS mit Standardabweichung verwendet werden.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

## **3. ABSCHLUSSBERICHT**

### **3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendete Zellen, Dichte und Passagenanzahl und Zeitpunkt der Behandlung, Anzahl der Zellkulturen;
- zur Erstellung der Zellkulturen verwendete Verfahren einschließlich Medium, Temperatur und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen;
- Prüfsubstanz, Lösungsmittelkonzentrationen und Begründung für die Wahl der in dem Versuch verwendeten Konzentrationen;
- nähere Angaben zu den Stoffwechsellaktivierungssystemen;
- Behandlungsplan;
- Positiv- und Negativkontrollen;

- verwendetes Autoradiographieverfahren;
- zur Blockierung des Eintritts der Zellen in die S-Phase verwendete Verfahren;
- zur DNS-Extraktion und Bestimmung des gesamten DNS-Gehalts im Rahmen des LSC-Verfahrens verwendete Methoden;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## B. 19

### IN VITRO-SCHWESTERCHROMATIDAUSTAUSCH-TEST

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugsubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Bei dem Schwesterchromatidaustausch — (SCE = Sister Chromatid Exchange) — Test handelt es sich um einen Kurzzeitest zur Ermittlung reziproker Austausche der DNS zwischen zwei Schwesterchromatiden eines sich replizierenden Chromosoms. SCE stellt den Austausch von DNS-Replikationsprodukten an anscheinend homologen Loci dar. Der Austauschprozeß umfaßt vermutlich Bruch und Reunion der DNS-Stränge, aber über seine Molekulargrundlage ist wenig bekannt. Zur Erkennung des SCE ist es erforderlich, die Schwesterchromatiden unterschiedlich zu markieren, was sich durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die Chromosomen-DNS während eines oder zwei Zellzyklen erreichen läßt.

Die Säugetierzellen werden *in vitro* mit und ohne Zusatz eines exogenen Säuger-Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz behandelt und während eines oder zweier Replikationszyklen in BrdU enthaltendem Medium kultiviert. Nach Behandlung mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin) zur Akkumulierung der Zellen in einem metaphasenähnlichen Stadium der Mitose (C-Metaphase) werden die Zellen gewonnen und Chromosomenpräparationen hergestellt.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitung*

- Für diese Versuche können Primärkulturen (z. B. menschliche Lymphozyten) oder etablierte Zelllinien (z. B. Ovarzellen des Chinesischen Hamsters) verwendet werden. Zelllinien sind auf *Mycoplasma*-Verunreinigung zu überprüfen;
- der Versuch ist mit geeigneten Kulturmedien und unter angemessenen Inkubationsbedingungen (z. B. Temperatur, Kulturgefäße, CO<sub>2</sub>-Konzentration und Feuchtigkeit) durchzuführen;
- die Prüfsubstanzen können in Kulturmedien oder in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert werden, bevor die Behandlung der Zellen beginnt. Die endgültige Konzentration eines Lösungsmittels im Kultursystem darf die Lebensfähigkeit der Zellen bzw. die Wachstumsrate nicht signifikant beeinflussen. Die Beeinflussung der SCE-Häufigkeit ist durch eine Lösungsmittelkontrolle zu überwachen;
- die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit und ohne Zusatz eines exogenen Säuger-Metabolisierungssystems erfolgen. Werden Zelltypen mit endogener Stoffwechselaktivität verwendet, sollte bekannt sein, daß die Substanzen der entsprechenden chemischen Klasse zu metabolisieren vermögen.

###### *Versuchsbedingungen*

###### Anzahl der Kulturen

Für jeden experimentellen Punkt sind mindestens zwei Kulturen zu verwenden.

#### Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen

Bei jedem Versuch sind Positivkontrollen heranzuziehen sowohl unter Verwendung einer direkt wirksamen Substanz als auch einer Substanz, die eine Stoffwechselaktivierung erfordert. Auch eine Lösungsmittelkontrolle ist zu verwenden.

Folgende Substanzen können beispielsweise als Positivkontrollen verwendet werden:

- direkt wirksame Verbindungen:
  - Ethyl-Methansulfonat,
- indirekt wirksame Verbindungen:
  - Cyclophosphamid.

Gegebenenfalls kann eine zusätzliche Positivkontrolle mit einer Substanz durchgeführt werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die Prüfsubstanz.

#### Konzentrationen

Es sind mindestens drei geeignete Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Die höchste Konzentration sollte eine signifikant toxische Wirkung ausüben, muß jedoch noch eine adäquate Zellreplikation zulassen. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Prüfsubstanzkonzentration von Fall zu Fall festzulegen.

#### Versuchsdurchführung

##### Vorbereitung der Kulturen

Zellen etablierter Zelllinien werden aus Stammkulturen isoliert (z. B. durch Trypsinierung bzw. Abschütteln), in Kulturgefäße in geeigneter Dichte ausgesät und bei 37 °C inkubiert.

Bei einschichtigen Kulturen ist die Anzahl der Zellen pro Kulturgefäß so zu wählen, daß die Kulturen zum Zeitpunkt der Aufarbeitung zu nicht viel mehr als 50% konfluent sind. Die Zellen können auch in einer Suspensionskultur gehalten werden. Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden unter Verwendung geeigneter Verfahren mit heparinisiertem Blut angelegt und bei 37 °C inkubiert.

##### Behandlung

Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase werden während einer angemessenen Zeitdauer mit der Prüfsubstanz behandelt. In den meisten Fällen reichen ein bis zwei Stunden aus, doch kann die Behandlungszeit in bestimmten Fällen auf maximal zwei vollständige Zellzyklen verlängert werden. Zellen ohne ausreichende Stoffwechselaktivität sind sowohl mit als auch ohne Zugabe eines geeigneten Metabolisierungssystems mit der Prüfsubstanz zu behandeln. Nach Ende der Behandlungszeit wird durch Waschen der Zellen die Prüfsubstanz entfernt. Die Zellen werden während eines oder zweier Replikationszyklen in Anwesenheit von BrdU kultiviert. Alternativ kann die Behandlung der Zellen während der gesamten Kultivierungszeit von zwei Zellzyklen mit der Prüfsubstanz und BrdU gleichzeitig erfolgen.

Kulturen von menschlichen Lymphozyten werden behandelt, während sie sich in semisynchronem Zustand befinden.

Die Aufarbeitung der Zellen erfolgt zum Zeitpunkt ihrer zweiten Teilung nach der Behandlung, wobei sicherzustellen ist, daß die empfindlichsten Stadien des Zellzyklus mit der Substanz behandelt wurden. An allen Kulturen, denen BrdU beigegeben wurde, sind die entsprechenden Verrichtungen bis zur Gewinnung der Zellen im Dunkeln oder bei entsprechend schwacher Beleuchtung vorzunehmen, um die Photolyse von BrdU-haltiger DNS so gering wie möglich zu halten.

##### Gewinnung der Zellen

Ein bis vier Stunden vor der Aufarbeitung werden die Zellkulturen mit einem Spindelgift (z. B. Colchicin) behandelt. Jede Kultur wird einzeln gewonnen und getrennt zur Chromosomenpräparation aufgearbeitet.

##### Präparation und Färbung von Chromosomen

Die Chromosomenpräparate werden mit zytogenetischen Standardverfahren angefertigt. Die Färbung der Objektträger zur Darstellung der SCE ist mit verschiedenen Verfahren möglich (z. B. dem Fluoreszenzplus-Giems-Verfahren).

## Analyse

Die Anzahl der zu analysierenden Zellen ist unabhängig von der spontanen SCE-Häufigkeit. Normalerweise werden die SCE in mindestens 25 gut gespreiteten Metaphasen pro Kultur gezählt. Vor der Auswertung werden die Objektträger kodiert. Bei Verwendung menschlicher Lymphozyten wertet man nur die Metaphasen mit 46 Zentromeren aus. Bei Verwendung etablierter Zelllinien werden nur Metaphasen ausgewertet, deren Zentromerzahl dem häufigsten Wert  $\pm 2$  entspricht. Er ist anzugeben, ob Farbsprünge im Zentromerbereich als SCE gezählt wurden oder nicht. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Für alle behandelten und Kontrollkulturen sind die SCE-Anzahl pro Metaphase und die SCE-Anzahl pro Chromosom für jede Kultur getrennt anzugeben.

Die Auswertung der Daten sollte unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren erfolgen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, Folgendes anzugeben:

- verwendete Zellen, Zellkulturbedingungen;
- Versuchsbedingungen: verwendete Medien, CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, Konzentration der Prüfsubstanz, verwendete Lösungsmittel, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, verwendetes Spindelgift (Konzentration und Behandlungsdauer), Typ des verwendeten Säugetier-Metabolisierungssystems, Positiv- und Negativkontrollen;
- Anzahl der Zellkulturen für jeden experimentellen Punkt;
- nähere Angaben über die Herstellung der Chromosomenpräparate;
- Anzahl der analysierten Metaphasen (die Werte sind für jede Kultur getrennt anzugeben);
- SCE-Anzahl pro Metaphase und pro Chromosom (die Werte sind für jede Kultur getrennt anzugeben);
- Kriterien für die Auswertung der SCE;
- Begründung der Dosierungswahl;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.



## B. 20

### TEST ZUR ERFASSUNG GESCHLECHTSGEBUNDENER REZESSIVER LETALMUTATIONEN AN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Mit dem Test zur Erfassung geschlechtsgebundener rezessiver Letalmutationen (sex-linked recessive lethal test = SLRL-Test) an *Drosophila melanogaster* lassen sich Mutationen — sowohl Punktmutationen als auch kleine Deletionen — in der Keimbahn des Insektes feststellen. Es handelt sich um einen Vorwärtsmutationenstest, mit dem eine Untersuchung auf Mutationen an etwa 800 Loci auf dem X-Chromosom (etwa 80 % aller X-Chromosom-Loci) möglich ist. Das X-Chromosom enthält etwa ein Fünftel des gesamten haploiden Genoms.

Mutationen im X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* werden in männlichen Trägern des Mutantengens phänotypisch exprimiert. Wenn eine letale Mutation in hemizygotem Zustand vorliegt, fehlt eine der beiden Klassen männlicher Nachkommen, die ein heterozygotes Weibchen normalerweise hervorbringt. Im SLRL-Test erkennt man diese Tatsachen mit Hilfe besonders markierter und angeordneter Chromosomen.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### Vorbereitung

###### Zuchten

Es können Männchen einer genau definierten Wildtypzucht und Weibchen der Zucht Muller-5 verwendet werden. Auch die Verwendung von anderen entsprechend markierten Weibchen mit multiplen invertierten X-Chromosomen ist möglich.

###### Prüfsubstanz

Die Prüfsubstanzen sind in Wasser zu lösen. Wasserunlösliche Substanzen können in geeigneten Lösungsmitteln (z. B. einer Mischung aus Ethanol und Tween-60 oder 80) gelöst oder suspendiert und dann vor der Verabreichung mit Wasser oder Kochsalzlösung verdünnt werden. Die Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel ist zu vermeiden.

###### Anzahl der Tiere

Empfindlichkeit und Signifikanzgrad des Tests sind vorher festzulegen. Die Anzahl der zu analysierenden behandelten Chromosomen hängt in hohem Maß von der spontanen Mutationsrate in entsprechenden Kontrollen ab.

###### Behandlung

Die Verabreichung kann oral, durch Injektion oder durch Exposition gegenüber Gasen oder Dämpfen erfolgen. Bei oraler Verabreichung kann die Prüfsubstanz in Zuckerlösung gegeben werden. Erforderlichenfalls können die Substanzen in einer 0,7%igen NaCl-Lösung gelöst und in Thorax oder Abdomen injiziert werden.

###### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Negativ- (Vehikel-) und Positivkontrollen sind zu verwenden. Stehen jedoch entsprechende Laborkontrollen zur Verfügung, sind keine gleichzeitigen Kontrollen erforderlich.

### Konzentrationen

Es sind drei Konzentrationen zu verwenden. Zur vorläufigen Abschätzung kann eine einzige Konzentration verwendet werden, und zwar entweder die höchste noch verträgliche Konzentration der Prüfsubstanz oder eine Konzentration, die gewisse Toxizitätsanzeichen hervorruft. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung gegenüber der höchstmöglichen Konzentration erfolgen.

### Versuchsdurchführung

Wildtypmännchen (3 bis 5 Tage alt) werden mit der Prüfsubstanz behandelt und einzeln mit mehreren jungfräulichen Weibchen aus der Muller-5-Zucht oder aus einer anderen entsprechend markierten Zucht (mit multiplen invertierten X-Chromosomen) gepaart. Die Weibchen werden alle zwei bis drei Tage durch neue jungfräuliche Tiere ersetzt, um den gesamten Keimzellzyklus abzudecken. Durch die Untersuchung der Nachkommen dieser Weibchen werden Letaleffekte in reifen Spermien, Spermatiden des mittleren oder späten Stadiums, frühen Spermatiden, Spermatozyten und Spermatogonien der behandelten Männchen erfaßt.

Heterozygote  $F_1$ -Weibchen aus den obigen Kreuzungen werden einzeln (d. h. ein Weibchen pro Flasche) mit ihren Brüdern gepaart. In der  $F_2$ -Generation wird in jeder Kultur festgestellt, ob Wildtypmännchen auftreten oder nicht. Gelangt man aufgrund der Tatsache, daß in einer Kultur keine  $F_2$ -Männchen mit dem behandelten Chromosom (Wildtyp) beobachtet werden, zu der Annahme, daß das  $F_1$ -Weibchen Träger eines Letalgens im väterlichen X-Chromosom ist, sind die Töchter dieses Weibchens mit dem gleichen Genotyp zu testen, um festzustellen, ob die Letalität auch in der nächsten Generation wieder auftritt.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Anzugeben ist die Anzahl der getesteten X-Chromosomen, die Anzahl der unfruchtbaren Männchen und die Anzahl der Letalmutationen für jede Konzentration, für jede Paarungsperiode und jedes behandelte Männchen. Auch sind Cluster verschiedener Größen pro Männchen anzugeben. Die Versuchsergebnisse sind in einem getrennten Versuch zu bestätigen.

Bei der Auswertung der SLRL-Tests sind geeignete statistische Verfahren zu verwenden. Cluster-Bildung rezessiver Letalmutationen, die von einem Männchen ausgehen, sind mit einem geeigneten statistischen Verfahren zu untersuchen und auszuwerten.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Zucht: verwendete *Drosophila*-zuchten oder -stämme, Alter der Insekten, Anzahl der behandelten Männchen, Anzahl der sterilen Männchen, Anzahl der etablierten  $F_2$ -Kulturen, Anzahl der  $F_2$ -Kulturen ohne Nachkommen, Anzahl der in den einzelnen Keimzellstadien festgestellten Chromosomen mit einer Letalmutation;
- Kriterien für die Festlegung der Größe der behandelten Gruppen;
- Versuchsbedingungen: eingehende Beschreibung des Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplans, Expositionskonzentrationen, Toxizitätsdaten, ggf. Negativ-(Lösungsmittel-) und Positivkontrollen;
- Kriterien für die Erfassung der Letalmutationen;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## B. 21

### IN VITRO-ZELLTRANSFORMATIONSTEST

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Mit Säugetierzell-Kultursystemen können durch chemische Substanzen induzierte phänotypische Veränderungen *in vitro* ermittelt werden, die mit malignen Transformationen *in vivo* in Zusammenhang gebracht werden. Häufig verwendete Zellen sind: C3H10T<sup>1/2</sup>, 3T3, SHE, Fisher-Ratten-Zellen. Die Tests beruhen auf Veränderungen der Zellmorphologie, Fokusbildung oder der Eigenschaft, im Weichagar wachsen zu können. Mit einigen weniger häufig verwendeten Systemen lassen sich andere physiologische oder morphologische Veränderungen der Zellen nach Exposition gegenüber karzinogenen Substanzen feststellen. Für keinen der *in-vitro*-Test-Endpunkte wurde eine kausale Beziehung zu Krebs nachgewiesen. Mit einigen der Testsysteme lassen sich Tumorpromotoren ermitteln. Die Zytotoxizität kann festgestellt werden anhand der Auswirkung der Prüfsubstanz auf das Kolonibildungsvermögen (Klonierungseffizienz) oder die Wachstumsraten der Kulturen. Durch Ermittlung der Zytotoxizität kann man feststellen, ob die Exposition gegenüber der Prüfsubstanz toxikologisch relevant war, man kann damit jedoch nicht in allen Versuchen die Transformationshäufigkeit berechnen, da bei einigen längere Inkubationszeiten und/oder Neuplattierungen erforderlich sind.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### Vorbereitung

###### Zellen

Je nach verwendetem Transformationstest stehen verschiedene Zelllinien oder primäre Zellen zur Verfügung. Der Untersucher muß sicherstellen, daß die Zellen in dem durchzuführenden Versuch nach der Exposition gegenüber bekannten Karzinogenen die entsprechenden phänotypischen Veränderungen aufweisen und daß Validität und Zuverlässigkeit des Tests in seinem Labor nachgewiesen und dokumentiert wurden.

###### Medien

Die Medien und Versuchsbedingungen müssen für den durchzuführenden Transformationsversuch geeignet sein.

###### Prüfsubstanz

Die Prüfsubstanzen können in einem Kulturmedium oder in geeigneten Vehikeln gelöst oder suspendiert werden, bevor die Behandlung der Zellen beginnt. Die Endkonzentration des Lösungsmittels im Kultursystem darf weder die Überlebensrate noch die Wachstumsrate der Zellen oder die Transformationsinzidenz beeinflussen.

###### Stoffwechselaktivierung

Die Behandlung der Zellen mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit und ohne Zusatz eines exogenen Säugetier-Metabolisierungssystems erfolgen. Werden Zelltypen mit endogener Stoffwechselaktivität verwendet, sollte bekannt sein, daß diese Zellen Substanzen der entsprechenden chemischen Klasse zu metabolisieren vermögen.

#### *Versuchsbedingungen*

##### **Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen**

Jeder Versuch sollte Positivkontrollen umfassen unter Verwendung sowohl einer direkt wirkenden Substanz als auch einer Substanz, bei der eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist. Auch eine Negativ-(Vehikel-)Kontrolle sollte angelegt werden.

Folgende Substanzen können beispielsweise als Positivkontrollen dienen:

- Direkt wirksame Verbindungen:
  - Ethyl-Methansulfonat
  - $\beta$ -Propiolacton,
- Verbindungen, bei denen eine Stoffwechselaktivierung erforderlich ist:
  - 2-Acetylaminofluoren,
  - 4-(Dimethylamino)-azobenzol,
  - 7,12-Dimethylbenzanthracen.

Gegebenenfalls ist eine weitere Positivkontrolle erforderlich, die der gleichen chemischen Klasse angehört, wie die zu untersuchende Substanz.

##### **Konzentrationen**

Es sind mehrere Konzentrationen der Prüfsubstanz zu verwenden. Diese Konzentrationen sollten eine konzentrationsabhängige toxische Wirkung ausüben, wobei die höchste Konzentration eine geringe Überlebensrate in der niedrigsten Konzentration etwa der in der negativen Kontrolle entspricht. Relativ wasserunlösliche Substanzen sind mit geeigneten Verfahren bis zur Löslichkeitsgrenze zu testen. Bei voll wasserlöslichen, nichttoxischen Substanzen ist die höchste Prüfkonzentration von Fall zu Fall festzulegen.

#### *Versuchsdurchführung*

Die Zellen sind je nach verwendetem Testsystem während einer angemessenen Zeitdauer zu exponieren; bei längerer Exposition kann deshalb eine Neudosierung mit Erneuerung des Mediums (und ggf. des Stoffwechselaktivierungs-Gemischs) erforderlich werden. Die Behandlung der Zellen ohne ausreichende eigene Stoffwechselaktivität mit der Prüfsubstanz sollte sowohl mit als auch ohne Zusatz eines geeigneten Stoffwechselaktivierungs-Systems erfolgen.

Nach Ende der Behandlungszeit wird die Prüfsubstanz durch Waschen von den Zellen entfernt. Dann werden die Zellen unter Bedingungen kultiviert, die es ermöglichen, den veränderten Phänotyp zu erfassen. Anschließend wird die Transformationsinzidenz ermittelt. Alle Ergebnisse sind in einem unabhängigen Versuch zu bestätigen.

## **2. DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form darzustellen. Je nach Versuch sind zum Beispiel Anzahl der Platten, Platten mit Transformation oder Anzahl der transformierten Zellen anzugeben. Gegebenenfalls ist die Überlebensrate als Prozentsatz der Überlebensrate in den Kontrollkulturen und die Transformationshäufigkeit als Anzahl der transformierten Zellen pro Anzahl der überlebenden Zellen auszudrücken.

Die Daten sind unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren abzusichern.

## **3. ABSCHLUSSBERICHT**

### **3.1. Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendeter Zelltyp, Anzahl der Zellenkulturen, Zellkulturbedingungen;
- Versuchsbedingungen, Konzentration der Prüfsubstanz, verwendetes Lösungsmittel, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, Behandlungsdauer und -häufigkeit, Zelldichte während der Behandlung, Art des verwendeten exogenen Stoffwechselaktivierungs-Systems, Positiv- und Negativkontrollen, genaue Beschreibung des zu erfassenden Phänotypes, ggf. verwendetes Selektivsystem, Begründung für die Wahl der Konzentrationen;

- das zur Zählung der lebenden und transformierten Zellen verwendete Verfahren;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## B. 22

### SÄUGER IN VIVO-DOMINANT-LETAL-TEST

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Dominante Letaleffekte bewirken den Tod des Embryos bzw. des Fötus. Die Induktion dominanter Letalgene durch Behandlung mit einer chemischen Substanz weist darauf hin, daß die Substanz das Keimgewebe der Tierart geschädigt hat. Man geht allgemein davon aus, daß dominante Letalgene auf Chromosomenschäden (strukturelle und numerische Anomalien) zurückgehen. Das Absterben des Embryos in behandelten Weibchen kann auch durch toxische Effekte bedingt sein.

Im allgemeinen werden die männlichen Tiere mit der Prüfsubstanz behandelt und dann mit unbehandelten jungfräulichen Weibchen gepaart. Die verschiedenen Keimzellstadien können durch Verwendung aufeinander folgender Paarungsintervalle getrennt getestet werden. Die Differenz zwischen der Anzahl der toten Implantate pro Weibchen in der behandelten Gruppe und der Anzahl toter Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe entspricht dem Postimplantationsverlust. Der Präimplantationsverlust kann abgeschätzt werden auf der Grundlage der *Corpora lutea* oder durch den Vergleich der Gesamtimplantate pro Weibchen in der behandelten und der Kontrollgruppe. Der gesamte dominante Letaleffekt entspricht der Summe der Prä- und Postimplantationsverluste. Die Berechnung des gesamten dominanten Letaleffekts beruht auf einem Vergleich der Zahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Versuchsgruppe mit der Zahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe. Eine Verringerung der Implantatenanzahl in bestimmten Paarungsgruppen kann darauf zurückzuführen sein, daß Zellen (z. B. Spermatozyten und/oder Spermato gonien) abgetötet wurden.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitung*

Die Prüfsubstanzen sind möglichst in isotonischer Kochsalzlösung zu lösen oder zu suspendieren. Wasserunlösliche Substanzen können in geeigneten Vehikeln gelöst oder suspendiert werden. Das verwendete Vehikel darf weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben. Es sind frische Lösungs- oder Suspensionsansätze zu verwenden.

###### *Versuchsbedingungen*

###### *Verabreichungsweg*

Die Prüfsubstanz sollte im allgemeinen nur einmal verabreicht werden. Wenn toxikologische Gründe dafür sprechen, ist eine wiederholte Behandlung möglich. Die üblichen Verabreichungswege sind per os oder intraperitoneal. Auch andere Verabreichungswege können geeignet sein.

###### *Versuchstiere*

Als Versuchstiere werden Ratten oder Mäuse empfohlen. Gesunde, voll geschlechtsreife Tiere werden randomisiert und Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeordnet.

#### Anzahl und Geschlecht

Man sollte eine ausreichende Anzahl behandelter Männchen verwenden, um der spontanen Variation des auszuwertenden biologischen Merkmales Rechnung zu tragen. Die Entscheidung über die Anzahl sollte auf der vorher festgelegten Erkennungsgenauigkeit und gewünschten Signifikanz-Schranke beruhen. So sollte in einem typischen Versuch die Anzahl der Männchen in jeder Dosierungsgruppe ausreichen, um 30 bis 50 trüchtige Weibchen pro Paarungsintervall zu erzielen.

#### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Normalerweise sind für jeden Versuch gleichzeitige Positiv- und Negativkontrollen erforderlich. Stehen Ergebnisse von positiven Kontrollen zur Verfügung, die in letzter Zeit im selben Labor erhoben wurden, so können anstelle einer gleichzeitigen Positivkontrolle diese Ergebnisse verwendet werden.

Bekannte Mutagene sind als Positivkontrollen mit einer angemessenen niedrigeren Dosierung (z. B. MMS, i. p., mit 10 mg/kg) zum Nachweis der Testempfindlichkeit zu verwenden.

#### Dosierung

Normalerweise sind drei verschiedene Dosierungen zu verwenden. Die hohe Dosierung sollte Toxizitätsanzeichen oder verringerte Fruchtbarkeit bei den behandelten Tieren hervorrufen. In bestimmten Fällen kann eine einmalige hohe Dosierung ausreichen.

#### „Limit“-Test

Nichttoxische Substanzen sind mit 5 g/kg bei einmaliger Verabreichung oder mit 1g/kg pro Tage bei mehrmaliger Verabreichung zu testen.

#### Versuchsdurchführung

Man kann nach verschiedenen Behandlungsplänen vorgehen. Am weitesten verbreitet ist die einmalige Verabreichung der Prüfsubstanz, doch kann man auch andere Behandlungspläne anwenden.

Einzelne Männchen werden in angemessenen Abständen der Behandlung mit einem oder zwei unbehandelten virginellen Weibchen verpaart. Die Weibchen und Männchen sollten mindestens während der Dauer eines Ostruszyklus zusammenbleiben oder solange, bis die Paarung stattgefunden hat. Eine erfolgte Paarung wird durch Anwesenheit von Spermia in der Vagina oder anhand eines Vaginalpfropfes festgestellt.

Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem Behandlungsplan; sie muß ausreichen, um alle Keimzellenstadien nach der Behandlung zu erfassen.

Die Weibchen werden in der zweiten Hälfte der Trächtigkeit getötet. Der Uterusinhalt wird zur Bestimmung der Anzahl toter und lebender Implantate untersucht. Eine Untersuchung der Ovarien zur Bestimmung der Anzahl der *Corpora lutea* ist möglich.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe der Anzahl der Männchen, der Anzahl der trüchtigen Weibchen und der Anzahl nicht trüchtiger Weibchen darzustellen. Die Ergebnisse jeder Paarung einschließlich der Identität jedes Männchens und Weibchens sind einzeln durchzuführen. Für jedes Weibchen ist die Paarungswoche, die den Männchen verabreichte Dosis und die Häufigkeit der lebenden und der toten Implantate anzugeben. Die Berechnung des gesamten dominanten Letaleffekts beruht auf einem Vergleich der Anzahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Versuchsgruppe mit der Anzahl der lebenden Implantate pro Weibchen in der Kontrollgruppe. Eine Analyse des Verhältnisses von toten und lebenden Implantaten aus der behandelten Gruppe verglichen mit dem gleichen Verhältnis aus der Kontrollgruppe ergibt den Postimplantationsverlust.

Werden frühes oder spätes Absterben gesondert erfaßt, muß dies aus den Tabellen hervorgehen. Wird der Präimplantationsverlust berechnet, ist er anzugeben. Der Präimplantationsverlust kann als Differenz zwischen der Anzahl der *Corpora lutea* und der Anzahl der Implantate oder als Verringerung der Durchschnittszahl der Implantate pro Uterus gegenüber den Kontrollpaarungen berechnet werden.

Die Auswertung der Daten erfolgt mit geeigneten statistischen Verfahren.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Art, Stamm, Alter und Gewicht der verwendeten Tiere, Anzahl der Männchen und Weibchen in Versuchs- und Kontrollgruppen;
- Prüfsubstanz, Lösungsmittel, getestete Dosierungen und Begründung für die Wahl der Dosierung, Negativ- und Positivkontrollen, Toxizitätsdaten;
- Behandlungsart und -dauer;
- Paarungsplan;
- Verfahren zur Feststellung, ob die Paarung erfolgt ist;
- Zeitpunkt der Tötung;
- Kriterien für die Erfassung der dominanten Letaleffekte;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.



## **B.23. SPERMATOGONIEN-CHROMOSOMENABERRATIONSTEST BEI SÄUGETIEREN**

### **1. METHODE**

Diese Methode entspricht der OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

#### **1.1 EINLEITUNG**

Der In-vivo-Spermatogonientest auf Chromosomenaberrationen bei Säugetieren dient zum Nachweis von Agenzien, die bei Säugetieren strukturelle Chromosomenaberrationen in den Spermatogonien auslösen (1)(2)(3)(4)(5). Dabei ist zwischen strukturellen Chromosomentyp- und Chromatidentypaberrationen zu unterscheiden. Bei der Mehrzahl der chemischen Mutagene sind die Aberrationen dem Chromatidentyp zuzuordnen, doch kommen auch Chromosomentypaberrationen vor. Allerdings ist diese Methode nicht zur Messung numerischer Aberrationen bestimmt und wird folglich auch nicht routinemäßig dafür eingesetzt. Chromosomenmutationen und ähnliche Vorgänge sind die Ursache für zahlreiche humangenetische Erkrankungen.

Mit diesem Test werden Chromosomenveränderungen in Spermatogonien ermittelt, so daß Prognosen zur Auslösung vererbbarer Mutationen in Keimzellen möglich sind.

Bei dieser Prüfung werden routinemäßig Nagetiere eingesetzt. Mit diesem zytogenetischen In-vivo-Test werden Chromosomenaberrationen in Mitosen von Spermatogonien ermittelt. Andere Zielzellen sind nicht Gegenstand dieser Methode.

Zum Nachweis von Chromatidentypaberrationen in Spermatogonien ist die erste mitotische Zellteilung nach der Behandlung zu untersuchen, bevor diese Läsionen bei anschließenden Zellteilungen verlorengehen. Die meiotische Chromosomenanalyse der Spermatozyten in der Diakinese-Metaphase I auf Chromosomenaberrationen nach Behandlung der Spermatogoniestammzellen kann weitere nützliche Informationen liefern.

Mit dem In-vivo-Test soll ermittelt werden, ob Mutagene für somatische Zellen auch in Keimzellen aktiv sind. Darüber hinaus ist der Keimzellentest für die Bewertung des mutagenen Risikos von Relevanz, da er die Berücksichtigung von Faktoren des In-vivo-Stoffwechsels, der Pharmakokinetik und der DNA-Reparaturprozesse ermöglicht.

In den Hoden finden sich mehrere Generationen von Spermatogonien mit einem Spektrum der Empfindlichkeit gegenüber chemischer Behandlung. Die festgestellten Aberrationen stellen also eine Gesamtreaktion der behandelten Spermatogonienpopulationen dar, wobei die zahlreicheren differenzierten Spermatogonien dominieren. Je nach ihrer Position im Hoden sind einzelne Generationen von Spermatogonien dem allgemeinen Kreislauf ausgesetzt oder nicht, und zwar wegen der physischen und physiologischen Sertoli-Zellen-Schranke und der Blut-Hoden-Schranke.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, daß die Prüfsubstanz oder ein reaktiver Metabolit das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

## 1.2 DEFINITIONEN

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

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

**Lücke:** achromatische Läsion von geringerer Breite als eine Chromatide und mit minimaler Verlagerung der Chromatiden.

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

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

**Strukturelle Aberration:** Veränderung der Chromosomenstruktur, nachweisbar durch mikroskopische Untersuchung des Metaphase-Stadiums der Zellteilung, äußert sich in Form von Deletionen, intrachromosalen oder reziproken Translokationen.

## 1.3 PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz mittels einer geeigneten Expositionsform verabreicht und werden zu einem geeigneten Zeitpunkt nach der Behandlung getötet. Vor der Tötung werden die Tiere mit einem Spindelgift (z.B. Colchicin oder Colcemid®) behandelt. Aus den Keimzellen werden dann Chromosomen präpariert und gefärbt, und die Metaphasezellen werden auf Chromosomenaberrationen untersucht.

## 1.4 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

### 1.4.1 Vorbereitungen

#### 1.4.1.1 Versuchstiere

Gewöhnlich werden männliche chinesische Hamster und Mäuse verwendet, doch kommen auch männliche Tiere anderer geeigneter Säugetierarten in Frage. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn der Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

#### 1.4.1.2 Haltungs- und Fütterungsbedingungen

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60 % anzustreben.

#### 1.4.1.3 Vorbereitung der Tiere

Gesunde und geschlechtsreife junge Männchen werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Die Tiere werden vor Beginn der Studie über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

#### 1.4.1.4 *Vorbereitung der Dosierung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, es sei denn, die Stabilität der Substanz bei Lagerung wird nachgewiesen .

#### 1.4.2 **Prüfbedingungen**

##### 1.4.2.1 *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

##### 1.4.2.2 *Kontrollen*

Für jeden Versuch und jedes Geschlecht sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppen ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die Positivkontrollen sollten *in vivo* strukturelle Chromosomenaberrationen in Spermatogonien hervorrufen, wenn sie in Expositionskonzentrationen verabreicht werden, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben.

Die Positivkontrollkonzentrationen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Ablesen nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird und nur eine Probenahme erfolgt. Gegebenenfalls könnte eine zusätzliche Positivkontrolle herangezogen werden, die der gleichen chemischen Klasse angehört wie die zu prüfende Substanz. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

Substanz	CAS-Nummer	EINECS-Nummer
Cyclophosphamid	50-18-0	200-015-4
Cyclophosphamidmonohydrat	6055-19-2	
Cyclohexylamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomeres Acrylamid	79-06-1	201-173-7
Triethylenmelamin	51-18-3	200-083-5

Zu jedem Zeitpunkt der Probenahme sind Tiere der Negativkontrolle einzubeziehen, die lediglich ein Lösungsmittel oder Vehikel erhalten und ansonsten ebenso wie die Behandlungsgruppen behandelt werden, soweit nicht aus historischen Kontrolldaten akzeptable Werte zur Variabilität der Tiere und Häufigkeit der Zellen mit Chromosomenaberrationen vorliegen. Darüber hinaus sollten auch unbehandelte Kontrolltiere verwendet werden, soweit nicht historische oder veröffentlichte Kontrolldaten belegen, daß das gewählte Lösungsmittel/Vehikel keine schädlichen oder mutagenen Wirkungen hervorruft.

## 1.5 VERFAHREN

### 1.5.1 Anzahl der Tiere

Jede Behandlungs- und Kontrollgruppe muß mindestens 5 analysierbare Tiere umfassen.

### 1.5.2 Behandlungsplan

Die Prüfsubstanzen sind möglichst als Einmal- oder Zweimalgabe zu verabreichen. Die Gabe kann in Form von zwei Teilmengen erfolgen, die am gleichen Tag im Abstand von wenigen Stunden verabreicht werden, wenn es sich um ein großes Materialvolumen handelt. Andere Verabreichungsschemata sollten wissenschaftlich begründet sein.

In der Gruppe mit der höchsten Dosis wird nach der Behandlung zu zwei verschiedenen Zeitpunkten eine Stichprobe entnommen. Da die Zellzykluskinetik von der Prüfsubstanz beeinflusst werden kann, erfolgt eine Probenahme ca. 24 Stunden und die andere ca. 48 Stunden nach der Behandlung. Bei den übrigen Dosen sollte die Probenahme 24 Stunden nach der Behandlung oder nach Ablauf eines Zeitraums erfolgen, der der 1,5fachen Dauer des normalen Zellzyklus entspricht, wenn nicht ein anderer Zeitpunkt erwiesenermaßen zur Feststellung von Effekten günstiger ist (6).

Für die Probenahme kommen auch andere Zeitpunkte in Frage. Bei Chemikalien, die eine Chromosomenverzögerung bewirken oder S-unabhängige Effekte auslösen können, ist möglicherweise eine Probenahme zu einem früheren Zeitpunkt angebracht (1).

Die Zweckmäßigkeit einer wiederholten Behandlung ist im Einzelfall zu prüfen. Bei wiederholter Behandlung sind die Tiere 24 Stunden (1,5facher Zellzyklus) nach der letzten Gabe zu töten. Ggf. sind zusätzliche Zeiten für die Probenahme vorzusehen.

Vor der Tötung wird den Tieren intraperitoneal eine geeignete Dosis eines Spindelgiftes (z.B. Colcemid® oder Colchicin) verabreicht. Eine Stichprobe wird den Tieren danach zu einem geeigneten Zeitpunkt entnommen. Bei Mäusen beträgt der Zeitabstand ca. 3 bis 5 Stunden, bei chinesischen Hamstern ca. 4 bis 5 Stunden.

### 1.5.3 Dosierungen

Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen (7). Liegt Toxizität vor, so sind zum ersten Zeitpunkt der Probenahme drei Dosisstufen zu verwenden. Die Dosisstufen sollten den Bereich vom Höchstwert bis zu geringer oder nicht vorhandener Toxizität umfassen. Bei der späteren Probenahme muß nur die Höchstdosis verwendet werden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen.

Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in den Spermatogonien hervorruft (z.B. eine Reduzierung des Verhältnisses der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase; diese Reduzierung sollte nicht mehr als 50 % betragen).

#### 1.5.4 **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Genotoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen verzichtet werden. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

#### 1.5.5 **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde bzw. durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von Reizstoffen oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Mindestmaß zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

#### 1.5.6 **Chromosomenpräparation**

Unmittelbar nach der Tötung werden aus einem oder beiden Hoden Zellsuspensionen gewonnen, mit hypotoner Lösung behandelt und fixiert. Die Zellen werden dann auf Objektträger aufgetropft und gefärbt.

#### 1.5.7 **Analyse**

Es sind mindestens 100 gut gespreitete Metaphasen je Tier (d.h. mindestens 500 Metaphasen je Gruppe) zu analysieren. Eine zahlenmäßige Reduzierung ist möglich, wenn eine hohe Zahl von Aberrationen beobachtet wird. Alle Objektträger, auch die für die Positiv- und Negativkontrollen, sind vor der mikroskopischen Untersuchung von unabhängiger Seite zu kodieren. Da es bei der Fixierung häufig zum Bruch eines Teils der Metaphasezellen unter Verlust von Chromosomen kommt, sollten die ausgewerteten Zellen daher eine Zentromerzahl enthalten, die bei allen Zelltypen der Zahl  $2n \pm 2$  entspricht.

### 2. **DATEN**

#### 2.1 **AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE**

Die Daten für die einzelnen Tiere sind in tabellarischer Form darzustellen. Versuchseinheit ist das Tier. Für jedes Tier sind die Anzahl der Zellen mit strukturellen Chromosomenaberrationen und die Anzahl der Chromosomenaberrationen je Zelle anzugeben. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen sind die unterschiedlichen Typen struktureller Chromosomenaberrationen mit Anzahl und Häufigkeit aufzuführen. Lücken werden getrennt erfaßt und angegeben, aber in der Regel nicht bei der Gesamthäufigkeit der Aberrationen berücksichtigt.

Wird Mitose sowie Meiose beobachtet, ist das Verhältnis der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase als Gradmesser der Zytotoxizität bei allen behandelten Tieren und Tieren der Negativkontrolle in einer Gesamtstichprobe von 100 sich teilenden Zellen zu bestimmen, um eine mögliche zytotoxische Wirkung festzustellen. Wird nur Mitose beobachtet, so ist der Mitoseindex für mindestens 1000 Zellen je Tier zu bestimmen.

Es gibt mehrere Kriterien für die Bestimmung eines positiven Ergebnisses, wie z.B. eine dosisbezogene Zunahme der Anzahl der Zellen mit Chromosomenaberrationen oder eine eindeutige Zunahme der Anzahl der Zellen mit Aberrationen in einer bestimmten Dosisgruppe zu einem bestimmten Zeitpunkt der Probenahme. Zunächst sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse untersucht werden. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen (8). Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein. Nicht eindeutige Ergebnisse sollten durch weitere Prüfungen abgeklärt werden, möglichst unter Abänderung der Versuchsbedingungen.

Eine Prüfsubstanz, bei der die Ergebnisse nicht den obengenannten Kriterien entsprechen, gilt bei diesem Versuch als nichtmutagen.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Positive Befunde des In-vivo-Keimzellentests auf Chromosomenaberrationen deuten darauf hin, daß die Prüfsubstanz in den Keimzellen der untersuchten Spezies Chromosomenaberrationen hervorruft. Negative Befunde sind ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine Chromosomenaberrationen in den Keimzellen der untersuchten Spezies hervorruft.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz oder ihre Metaboliten in das spezifische Zielgewebe gelangen.

### **ABSCHLUSSBERICHT**

#### **PRÜFBERICHT**

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

##### Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

##### Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl und Alter der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe;

#### Prüfbedingungen:

- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für die Tötungszeiten;
- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;
- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Bezeichnung des Spindelgifts, Konzentration und Behandlungsdauer;
- Methoden zur Präparation des Objektträgers;
- Kriterien zur Bewertung von Aberrationen;
- Anzahl der analysierten Zellen pro Tier;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

#### Ergebnisse:

- Toxizitätszeichen;
- Mitoseindex;
- Verhältnis der Spermatogonienmitosen zur ersten und zweiten meiotischen Metaphase;
- Typ und Anzahl der Aberrationen, für jedes Tier gesondert anzugeben;
- Gesamtzahl der Aberrationen pro Gruppe;
- Anzahl der Zellen mit Aberrationen pro Gruppe;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Analysen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativkontrollen;
- Daten zu historischen Negativkontrollen mit ~~Spannen~~ **Bereichen**, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Daten zu gleichzeitigen Positivkontrollen;
- ggf. beobachtete Veränderungen der Ploidie.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

**LITERATURHINWEISE**

1. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. Und Magnusson, J. (Hrsg.) Liss, New York, 477-484.
2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Hrsg. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, 275-306.
3. Evans, E.P., Breckon, G. und Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.
4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. und Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Hrsg.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 115-141.
5. Yamamoto, K. und Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.
6. Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. und Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
7. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, J., Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G., Hodson-Walker, G., Morton, D.B., Kirkland, D.J. und Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.
8. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. und Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Hrsg.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, 184-232.



## B. 24

### IN VIVO-SÄUGER-FELLFLECKENTEST DER MAUS

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Es handelt sich um einen *in-vivo*-Test mit Mäusen, bei dem in der Entwicklung befindliche Embryonen *in utero* mit den Prüfsubstanzen behandelt werden. Die Zielzellen in diesen Embryonen sind die Melanoblasten, die Zielgene diejenigen Gene, die die Pigmentierung der Fellhaare steuern. Die in der Entwicklung befindlichen Embryonen sind heterozygot für eine Anzahl dieser Fellfarbgene. Eine Mutation oder der Verlust (ausgelöst durch verschiedene genetische Ereignisse) des dominanten Allels eines derartigen Gens in einem Melanoblasten führt zur Expression des rezessiven Phänotyps. Im Fell der aus dem Embryo entstandenen Maus ist an einer Stelle ein Fleck mit einer anderen Farbe zu sehen. Die Anzahl der Nachkommen mit andersfarbigen Flecken wird erfaßt. Ihre Häufigkeit wird mit der Häufigkeit beim Nachkommen aus der Lösungsmittelkontrolle verglichen. Mit dem „Mouse Spot Test“ lassen sich mutmaßliche somatische Mutationen in fetalen somatischen Zellen feststellen.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### Vorbereitung

Die Prüfsubstanzen sind möglichst in isotonischer Kochsalzlösung zu lösen oder zu suspendieren. Wasserunlösliche Substanzen werden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert. Das verwendete Lösungsmittel darf weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben. Es sind frische Lösungen oder Suspensionen der Prüfsubstanz zu verwenden.

###### Versuchstiere

Mäuse des Teststammes T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye,  $c^{ch} p/c^{ch} p$ ; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) werden entweder mit dem Harwell Test-Stamm HT (pallid, nonagouti, brachypodi, pa a bp/pa a bp; leaden, fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe) oder mit C57 BL (nonagouti, a/a) gepaart. Auch andere geeignete Kreuzungen, wie zwischen NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) und DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d), können verwendet werden, sofern die nonagouti-Nachkommen hervorbringen.

###### Anzahl und Geschlecht

Es sind so viele trächtige Weibchen zu behandeln, daß für jede verwendete Dosierung eine geeignete Anzahl Nachkommen geboren wird. Welche Stichprobengröße angemessen ist, hängt von der an den behandelten Mäusen beobachteten Fleckenrate und der Größe der Kontrolldaten ab. Ein negatives Ergebnis ist nur dann annehmbar, wenn mindestens 300 Nachkommen von Weibchen, die mit der höchsten Dosierung behandelt wurden, erfaßt worden sind.

###### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Es sollten gleichzeitig erhobene Kontrolldaten von Mäusen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden (negative Kontrollen), verfügbar sein. Zur Erhöhung der Testempfindlichkeit können die Daten der in der Vergangenheit im selben Labor durchgeführten Kontrollen zusammengefaßt werden, sofern sie homogen sind.

Läßt sich eine Mutagenität der Prüfsubstanz nicht feststellen, sollten Positivkontrolldaten zur Verfügung stehen, die in letzter Zeit im selben Labor mit einer Substanz ermittelt wurden, deren Mutagenität sich nachweislich mit diesem Test feststellen läßt.

#### Verabreichungsweg

Normalerweise wird die Prüfsubstanz den trächtigen Weibchen per os oder intraperitoneal verabreicht. Ggf. erfolgt die Exposition durch Inhalation, oder es wird eine andere Verabreichung verwendet.

#### Dosierung

Es kommen mindestens zwei Dosierungen zur Anwendung, von denen eine Anzeichen von Toxizität hervorruft oder eine verringerte Wurfgröße bewirkt. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung mit der höchstmöglichen Dosierung erfolgen.

#### Versuchsdurchführung

Normalerweise erfolgt eine einmalige Behandlung an Tag 8, 9 oder 10 der Trächtigkeit, wobei als Tag 1 der Tag gewählt wird, an dem der Vaginalpfropf festgestellt wird. Diese Tage entsprechen 7,25, 8,25 und 9,25 Tagen nach Empfängnis. Es können sukzessive Behandlungen an diesen Tagen durchgeführt werden.

#### Analyse

Die Nachkommen werden kodiert und drei bis vier Wochen nach der Geburt auf Fellflecken untersucht. Man unterscheidet zwischen drei Kategorien von Flecken:

- a) weiße Flecken im Bereich von 5 mm um die mittlere Ventrallinie, die vermutlich auf das Abtöten von Zellen zurückzuführen sind (WMVS);
- b) gelbe, agouti-ähnliche Flecken in Mamma-, Genitalien-, vorderen Hals-, Axillar- und Inguinalbereich sowie auf der Mitte der Stirn, die vermutlich durch Fehldifferenzierung bedingt sind (MDS);
- c) über das gesamte Fell verteilt auftretende pigmentierte und weiße Flecken, die vermutlich auf somatische Mutationen zurückgehen (RS).

Alle drei Kategorien werden quantitativ erfaßt, doch ist nur die letzte, die Kategorie RS, von genetischer Relevanz. Probleme bei der Unterscheidung zwischen MDS und RS lassen sich durch Fluoreszenzmikroskopie von Haarproben lösen.

Deutliche makroskopische morphologische Abnormalitäten der Nachkommen sind zu vermerken.

## 2. DATEN

Anzugeben ist die Gesamtzahl der erfaßten Nachkommen und die Anzahl der Nachkommen, die einen oder mehrere, vermutlich durch somatische Mutationen bedingte Flecken aufweisen. Die Daten, bezogen auf die Wurfgröße, sollten ebenfalls angegeben werden. Die Behandlungs- und Negativkontrolldaten werden mit geeigneten statistischen Verfahren verglichen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- die zur Kreuzung verwendeten Stämme;
- Anzahl der trächtigen Weibchen in den Versuchs- und Kontrollgruppen;
- die durchschnittliche Wurfgröße in den Versuchs- und Kontrollgruppen bei der Geburt und beim Absetzen;
- Dosierung(en) der Prüfsubstanz;
- verwendetes Lösungsmittel;

- Tag der Trächtigkeit, an dem die Behandlung durchgeführt wurde;
- Verabreichungsweg;
- Gesamtzahl der erfaßten Nachkommen und Anzahl der Nachkommen mit MWVS, MDS und RS in den Versuchs- und Kontrollgruppen;
- makroskopische morphologische Abnormitäten;
- ggf. Dosis-Wirkungs-Beziehung für RS;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## B. 25

### IN VIVO-SÄUGER-TRANSLOKATIONSTEST

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Mit dem Translokationstest der Maus lassen sich strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen, die in Säugetier-Keimzellen auftreten, unter Nachkommen der ersten Generation ermitteln. Bei den beobachteten Chromosomenveränderungen handelt es sich um reziproke Translokationen und — bei weiblichen Nachkommen — um X-Chromosomenverlust. Träger von Translokationen und XO-Weibchen weisen eine verringerte Fertilität auf, die man zur Auswahl von F<sub>1</sub>-Nachkommen für die zytogenetische Analyse nutzt. Bestimmte Translokationstypen (X-Autosomentranslokation und Zentromer/Telomer-Translokation) verursachen vollständige Sterilität. Translokationen werden zytogenetisch in meiotischen Zellen in der Diakinese-Metaphase I männlicher Tiere (entweder F<sub>1</sub>-Männchen oder Söhne von F<sub>1</sub>-Weibchen) beobachtet. Die XO-Weibchen lassen sich zytogenetisch aufgrund der Anwesenheit von 39 statt 40 Chromosomen in Knochenmarksmitosen identifizieren.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitung*

Die Prüfsubstanz wird in isotonomischer Kochsalzlösung gelöst. Wasserunlösliche Substanzen werden in geeigneten Lösungsmitteln gelöst oder suspendiert.

Es sind frisch zubereitete Lösungen oder Suspensionen der Prüfsubstanzen zu verwenden. Wird zur Erleichterung der Dosierung ein Lösungsmittel verwendet, darf dieses weder die Wirkung der Prüfsubstanz beeinträchtigen noch eine toxische Wirkung ausüben.

###### *Verabreichungsweg*

Die Prüfsubstanz wird normalerweise per os oder intraperitoneal verabreicht. Auch andere Verabreichungswege können geeignet sein.

###### *Versuchstiere*

Die Versuche werden an Mäusen durchgeführt, da deren Zucht und zytologische Untersuchung relativ einfach sind. Ein bestimmter Stamm ist nicht vorgeschrieben. Bei Anwendung der Fertilitätsuntersuchung sollte jedoch die durchschnittliche Wurfgröße des verwendeten Stammes mehr als acht Junge betragen und relativ konstant sein. Es werden gesunde, geschlechtsreife Tiere verwendet.

###### *Anzahl der Tiere*

Die erforderliche Anzahl der Versuchstiere hängt von der spontanen Translokationshäufigkeit und der für ein positives Ergebnis erforderlichen Erhöhung der Translokationshäufigkeit ab.

Normalerweise umfasst der Test die Untersuchung der männlichen F<sub>1</sub>-Nachkommen. Pro Dosierungsgruppe sind mindestens 500 männliche F<sub>1</sub>-Nachkommen zu testen. Werden auch weibliche F<sub>1</sub>-Nachkommen berücksichtigt, sind 300 Männchen und 300 Weibchen erforderlich.

#### Verwendung von Negativ- und Positivkontrollen

Geeignete Daten gleichzeitig durchgeführter und historischer Kontrollen sollten vorliegen. Stehen Ergebnisse von Positivkontrollen zur Verfügung, die in letzter Zeit im selben Labor erhoben wurden, so können diese Ergebnisse anstelle einer gleichzeitigen Positivkontrolle verwendet werden.

#### Dosierung

Getestet wird eine Dosierung. Dabei handelt es sich normalerweise um die höchste Dosis, die eine minimale toxische Wirkung ausübt, ohne jedoch das reproduktive Verhalten oder die Überlebensrate der behandelten Tiere zu beeinträchtigen. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung sind zwei zusätzliche niedrigere Dosierungen erforderlich. Bei nichttoxischen Substanzen sollte die Behandlung mit der höchstmöglichen Dosierung erfolgen.

#### Versuchsdurchführung

##### Behandlung und Paarung

Es stehen zwei Behandlungspläne zur Verfügung. Am häufigsten wird die einmalige Verabreichung der Prüfsubstanz gewählt. Auch die Verabreichung an 7 Tagen/Woche während 35 Tagen ist möglich. Die Anzahl der Paarungen nach der Behandlung richtet sich nach dem gewählten Behandlungsplan; es ist sicherzustellen, daß alle behandelten Keimzellstadien erfaßt werden. Nach dem Ende der Paarungsperiode werden die Weibchen einzeln in Käfigen untergebracht. Für jeden Wurf werden Geburtsdatum, Wurfgröße und Geschlecht der Jungen aufgezeichnet. Alle männlichen Jungen werden abgesetzt, alle weiblichen Jungen ausgesondert, sofern sie nicht in dem Versuch verwendet werden.

#### Untersuchung auf Translokationsheterozygotie

Es stehen zwei Verfahren zur Auswahl:

- Fertilitätsuntersuchung der  $F_1$ -Nachkommen und anschließende Ermittlung möglicher Translokationsträger durch zytogenetische Analyse
- zytogenetische Analyse aller männlichen  $F_1$ -Nachkommen ohne vorherige Auswahl der Fertilitätsuntersuchung.

##### a) Fertilitätsuntersuchung

Die verringerte Fertilität eines  $F_1$ -Tieres läßt sich durch Beobachtung der Wurfgröße bzw. Analyse des Uterusinhalts des mit diesem Tier gepaarten Weibchens feststellen.

Die Kriterien für die Bestimmung der normalen und reduzierten Fertilität sind jeweils für den verwendeten Mäusestamm festzulegen.

**Beobachtung der Wurfgröße:** Die zu untersuchenden  $F_1$ -Männchen werden einzeln mit Weibchen aus dem gleichen Versuch oder aus der Kolonie gepaart. Die Käfige werden ab dem 18. Tag nach der Paarung täglich inspiziert. Wurfgröße und Geschlecht der  $F_2$ -Nachkommen werden bei der Geburt aufgezeichnet; die Würfe werden danach ausgesondert. Bei der Untersuchung weiblicher  $F_1$ -Nachkommen behält man die  $F_2$ -Nachkommen kleiner Würfe zur weiteren Untersuchung. Weibliche Translokationsträger werden durch zytogenetischen Nachweis einer Translokation in wenigstens einem ihrer männlichen Nachkommen identifiziert. XO-Weibchen erkennt man daran, daß sich bei ihren Nachkommen das Geschlechtsverhältnis von 1:1 zu 1:2 (Männchen:Weibchen) ändert. Bei einem sequentiellen Verfahren werden normale  $F_1$ -Tiere nicht weiter untersucht, wenn der erste  $F_2$ -Wurf einen vorher festgelegten Normalwert erreicht oder überschreitet. Anderenfalls wird ein zweiter oder dritter  $F_2$ -Wurf untersucht.  $F_1$ -Tiere, die nach Inspektion von bis zu drei  $F_2$ -Würfen nicht als normal eingestuft werden können, werden entweder durch Analyse des Uterusinhaltes der mit ihnen gepaarten Weibchen weiter untersucht oder direkt einer zytogenetischen Analyse unterzogen.

**Analyse des Uterusinhalts:** Die Verringerung der Wurfgröße bei Translokationsträgern ist auf das Absterben von Embryonen zurückzuführen. Eine hohe Anzahl toter Implantate weist also auf eine Translokation in dem Versuchstier hin. Die zu untersuchenden  $F_1$ -Männchen werden jeweils mit zwei oder drei Weibchen gepaart. Ob eine Empfängnis stattgefunden hat, wird durch tägliche Untersuchung auf Vaginalpfropf zwischen 8 und 10 Uhr morgens festgestellt. 14 bis 16 Tage danach werden die Weibchen getötet; die Anzahl der lebenden und toten Implantate in ihren Uteri wird aufgezeichnet.

##### b) Zytogenetische Analyse

Es werden luftgetrocknete Hodenpräparate hergestellt. Translokationsträger lassen sich durch das Vorhandensein von Multivalentkonfigurationen in der Diakinese-Metaphase I in primären Spermatozyten identifizieren. Werden mindestens zwei Zellen mit Translokationsmultivalenten beobachtet, ist damit der erforderliche Nachweis erbracht, daß es sich bei dem untersuchten Tier um einen Translokationsträger handelt.

Erfolgt keine Zuchtauswahl, werden F<sub>1</sub>-Männchen zytogenetisch untersucht. Mindestens 25 Diakinese-Metaphasen I pro Männchen sind mikroskopisch auszuwerten. Bei F<sub>1</sub>-Männchen mit kleinen Hoden und Zusammenbruch der Meiose vor der Diakinese oder bei F<sub>1</sub>-Weibchen, bei denen XO-Verdacht besteht, ist eine Untersuchung der mitotischen Metaphasen in Spermatogonien oder im Knochenmark erforderlich. Das Vorhandensein eines ungewöhnlich langen und/oder kurzen Chromosoms in jeder von 10 Zellen beweist, daß eine bestimmte, für Männchen steril wirkende Translokation (Typ c/t) vorliegt. Einige X-Autosomentranslokationen, die männliche Sterilität verursachen, lassen sich nur durch Bandenanalyse mitotischer Chromosomen ermitteln. Das Vorhandensein von 39 Chromosomen in jeder von 10 Mitosen ist ein Beweis dafür, daß es sich um ein XO-Weibchen handelt.

## 2. DATEN

Die Daten werden in tabellarischer Form dargestellt.

Für jeden Paarungsabschnitt sind die durchschnittliche Wurfgröße und das Geschlechtsverhältnis bei der Geburt und beim Absetzen anzugeben. Die Angaben der Fertilitätsuntersuchung von F<sub>1</sub>-Tieren müssen die durchschnittliche Wurfgröße aus allen normalen Paarungen und die jeweiligen Wurfgrößen bei F<sub>1</sub>-Translokationsträgern umfassen. Zur Analyse des Uterinhalts sind die durchschnittliche Anzahl der lebenden und toten Implantate aus normalen Paarungen und die Anzahl der lebenden und toten Implantate aus jeder Paarung von F<sub>1</sub>-Translokationsträgern anzugeben.

Die Angaben zur zytogenetischen Analyse der Diakinese-Metaphase I sollten für jeden Translokationsträger die Anzahl der Multivalentkonfigurationstypen sowie die Gesamtzahl der Zellen umfassen.

Für sterile F<sub>1</sub>-Tiere sind die Gesamtzahl der Paarungen und die Dauer der Paarungsperiode anzugeben, ebenso die Hodengewichte und nähere Einzelheiten über die zytogenetische Analyse.

Für XO-Weibchen sind die durchschnittliche Wurfgröße, das Geschlechtsverhältnis unter den F<sub>2</sub>-Nachkommen und die Ergebnisse der zytogenetischen Analyse aufzuführen.

Erfolgt eine Vorauswahl möglicher F<sub>1</sub>-Translokationsträger aufgrund von Fertilitätsuntersuchungen, müssen die Tabellen auch Angaben darüber enthalten, bei wievielen dieser Tiere die Translokationsheterozygotie bestätigt wurde.

Auch die Daten aus Negativkontrollen und die Positivkontrollversuche sind anzuführen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Mäusestamm, Alter der Tiere, Gewicht der behandelten Tiere;
- Anzahl der Elterntiere beiderlei Geschlechts in Versuchs- und Kontrollgruppen;
- Prüfbedingungen, genaue Beschreibung der Behandlung, Dosierungen, Lösungsmittel, Paarungsplan;
- Anzahl und Geschlecht der Jungen pro Weibchen, Anzahl und Geschlecht der zur Translokationsanalyse aufgezogenen Jungen;
- Zeitpunkt der und Kriterien für die Translokationsanalyse;
- Anzahl und eingehende Beschreibung der Translokationsträger einschließlich Zuchtdaten und ggf. Daten über den Uterusinhalt;
- Zytogenetische Verfahren und nähere Angaben über die mikroskopische Analyse, möglichst mit Abbildungen;
- statistische Auswertung;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einhaltung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## B.26. PRÜFUNG AUF SUB-CHRONISCHE ORALE TOXIZITÄT

### 90-TAGE-TOXIZITÄSTUDIE BEI WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NAGETIEREN

#### 1. METHODE

Diese Methode zur Prüfung auf subchronische orale Toxizität entspricht der OECD TG 408 (1998).

##### 1.1 EINLEITUNG

Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale eines chemischen Stoffs kann die Bestimmung der subchronischen Toxizität bei wiederholter oraler Verabreichung von Wirkstoffgaben durchgeführt werden, nachdem erste Toxizitätsdaten anhand von Prüfungen auf akute Toxizität oder 28-Tage-Tests auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung erzielt wurden. Die 90-Tage-Studie liefert Informationen über mögliche gesundheitliche Schädigungen, die durch wiederholte Exposition über einen längeren Zeitraum, einschließlich der Entwicklung nach dem Abstillen bis zum Erwachsensein, entstehen können. Die Studie liefert ferner Informationen über die wichtigsten toxischen Wirkungen, zeigt die Zielorgane und eine mögliche Akkumulation auf und kann zur Ableitung einer NOAEL (NOAEL – Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) beitragen, die zur Wahl der Dosierungen für Untersuchungen der chronischen Toxizität und zur Festlegung von Sicherheitskriterien für die Humanexposition herangezogen werden kann.

Die Methode legt außerdem den Schwerpunkt auf neurologische Endpunkte und liefert Hinweise auf immunologische und fortpflanzungsspezifische Wirkungen. Ferner wird die Notwendigkeit sorgfältiger klinischer Beobachtung der Tiere hervorgehoben, um möglichst umfangreiche Informationen zu erhalten. Durch diese Studie sollten chemische Stoffe mit potentieller neurotoxischer und immunologischer Wirkung sowie Wirkung auf die Fortpflanzungsorgane ermittelt werden, die gegebenenfalls weitergehende Untersuchungen erforderlich machen.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Dosis** ist die Menge der verabreichten Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Gewicht (g, mg) oder als Gewicht der Prüfsubstanz je Gewichtseinheit des Versuchstiers (z.B. mg/kg) oder als konstante Futterkonzentration (ppm) ausgedrückt.

**Dosierung** ist ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfaßt.

**NOAEL** ist die Abkürzung für "no-observed adverse effect level" und entspricht der höchsten Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

##### 1.3 PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird täglich über einen Zeitraum von 90 Tagen in abgestuften Dosen an mehrere Gruppen von Versuchstieren verabreicht, und zwar eine Dosisstufe je Gruppe. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere sorgfältig auf Toxizitätsanzeichen beobachtet. Während der Prüfung verendete oder getötete Tiere werden seziert. Am Ende der Prüfung werden alle noch lebenden Tiere getötet und ebenfalls seziert.

## 1.4 BESCHREIBUNG DER METHODE

### 1.4.1 **Vorbereitung der Tiere**

Zu verwenden sind gesunde Tiere, die mindestens fünf Tage an die Laborbedingungen gewöhnt und bisher nicht für Tierversuche verwendet wurden. Von den Versuchstieren sollten Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter festgestellt werden. Die Tiere werden nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, daß etwaige durch den Standort bedingte Auswirkungen so gering wie möglich sind. Jedes Versuchstier sollte zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer erhalten.

### 1.4.2 **Zubereitung der Dosen**

Die Prüfsubstanz wird über eine Magensonde, mit der Nahrung oder dem Trinkwasser verabreicht. Die Methode der oralen Verabreichung hängt von dem Zweck der Studie und den physikalischen/chemischen Eigenschaften des Prüfmaterials ab.

Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Medium gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, sodann eine Lösung/Emulsion in Öl (z.B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in anderen Medien in Betracht zu ziehen. Bei anderen Medien als Wasser müssen seine toxischen Merkmale bekannt sein. Die Stabilität der Prüfsubstanz unter den Verabreichungsbedingungen ist festzustellen.

### 1.4.3 **Prüfbedingungen**

#### 1.4.3.1 *Versuchstiere*

Die bevorzugte Nagetierart ist die Ratte, doch können als Versuchstiere auch andere Nagetierarten, z. B. die Maus, verwendet werden. Es sind junge, gesunde und ausgewachsene Tiere üblicher Laborstämme zu verwenden. Die weiblichen Tiere dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Mit der Dosierung sollte möglichst bald nach der Entwöhnung begonnen werden, auf jeden Fall jedoch, bevor die Tiere neun Wochen alt sind. Bei Beginn der Studie sollten die Gewichtsunterschiede der Tiere möglichst gering sein und  $\pm 20\%$  des geschlechtsspezifischen Durchschnittsgewichts nicht überschreiten. Wenn die Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität durchgeführt wird, sollten in beiden Studien Tiere desselben Stamms und derselben Herkunft verwendet werden.

#### 1.4.3.2 *Zahl und Geschlecht der Versuchstiere*

Für jede Dosisstufe sind mindestens 20 Tiere (zehn weibliche und 10 männliche) zu verwenden. Sollen im Verlauf der Prüfung Tiere getötet werden, ist die Zahl der Tiere um die Zahl zu erhöhen, die bereits vor Abschluß der Studie getötet werden sollen. Aufgrund bereits bekannter Wirkungen des chemischen Stoffs oder eines eng verwandten Analogons sollte darüber hinaus für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit der höchsten Dosis die Aufnahme einer Satellitengruppe von zehn Tieren (fünf jeden Geschlechts) zwecks Behandlung und anschließender Beobachtung der Reversibilität oder Persistenz etwaiger toxischer Wirkungen erwogen werden. Die Dauer dieses Zeitraums nach der Behandlung sollte den beobachteten Wirkungen angemessen sein.



#### 1.4.3.3 *Dosierung*

Es sollten mindestens drei Dosierungen und eine gleichzeitige Kontrolle verwendet werden, es sei denn, ein Limit-Test wird durchgeführt (s. 1.4.3.4). Die Dosierungen können auf der Grundlage der Ergebnisse von Studien mit wiederholter Verabreichung oder Studien zur Ermittlung des Dosisbereichs festgelegt werden und sollten sämtliche für die Prüfsubstanz oder verwandte Materialien verfügbaren toxikologischen und toxikokinetischen Daten berücksichtigen. Außer wenn dies wegen der physikalisch-chemischen Eigenschaften oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz unmöglich ist, sollte die höchste Dosierung gewählt werden, um Toxizität, jedoch nicht Tod oder schweres Leiden der Tiere zu induzieren. Zum Nachweis dosisabhängiger Reaktionen und einer NOAEL bei niedrigster Dosierung, sollten die Dosierungen in absteigender Folge verabreicht werden. Zwei- bis vierfache Abstände haben sich oft als optimale Dosisabstufungen erwiesen, auch ist meist eine vierte Testgruppe der Anwendung sehr großer Dosisabstände (z.B. mehr als ein Faktor von ca. 6-10) vorzuziehen.

Die Kontrollgruppe sollte eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikel-Kontrollgruppe sein, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollten die Tiere der Kontrollgruppe identisch mit denen der Testgruppen behandelt werden. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, und führt dies zu einer verminderten Futteraufnahme, kann eine paarweise gefütterte Kontrollgruppe nützlich sein, wobei zwischen einer verminderten Futteraufnahme aus geschmacklichen Gründen oder wegen toxikologischer Veränderungen im Prüfmodell unterschieden wird.

Zu berücksichtigen sind gegebenenfalls folgende Merkmale des Vehikel und anderer Additive: Wirkungen auf die Absorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz; Wirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die zur Änderung von führen toxischen Eigenschaften können kann; ferner Wirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere.

#### 1.4.3.4 *Limit-Test*

Ergibt eine Prüfung bei einer einzigen Dosis von mindestens 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag unter Anwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine adversen Effekte und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test ist anzuwenden, außer wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung bei einer höheren Dosis erforderlich erscheinen läßt.

### 1.5 **VERSUCHSDURCHFÜHRUNG**

#### 1.5.1 **Verabreichung der Dosen**

Die Versuchstiere erhalten die Prüfsubstanz an sieben Tagen der Woche über einen Zeitraum von 90 Tagen. Jede Abweichung von diesem Dosierungsplan, z. B. fünf Tage je Woche, ist zu begründen. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier mit einer Gabe verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Das Volumen sollte 1 ml/100g Körpergewicht nicht überschreiten, außer bei wässrigen Lösungen, von denen 2 ml/100g Körpergewicht gegeben werden können. Außer für Reizungen auslösende oder ätzende Stoffe, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.

Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, daß die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, können entweder eine konstante Futterkonzentration (ppm) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht des Versuchstiers verwendet werden. Die angewandte Alternative ist zu spezifizieren. Eine mit einer Magensonde verabreichte Dosis sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und so angepaßt werden, daß eine konstante Dosis in Relation zum Körpergewicht aufrechterhalten wird. Wird eine 90-Tage-Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität verwendet, sollte in beiden Studien die gleiche Nahrung gegeben werden.

## 1.5.2 **Beobachtungen**

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 90 Tage betragen. Tiere einer Satellitengruppe, die für Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, sollten für einen angemessenen Zeitraum ohne Behandlung bleiben, um festzustellen, ob die toxischen Wirkungen fortbestehen oder sich als reversibel erweisen.

Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise zur selben Tageszeit, unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist, vorgenommen werden. Der klinische Zustand der Tiere ist zu dokumentieren. Alle Tiere sind mindestens zweimal täglich, in der Regel morgens und abends, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen.

Mindestens einmal vor der ersten Exposition (für intraindividuelle Vergleiche) und danach einmal pro Woche sollten bei allen Tieren eingehende klinische Beobachtungen vorgenommen werden. Diese Beobachtungen sollten außerhalb des Käfigs erfolgen, in dem die Tiere gehalten werden, und zwar vorzugsweise in einem Standardgehege jeweils zu denselben Zeiten. Sie sind sorgfältig zu dokumentieren, am besten nach einer speziell vom Prüflabor entwickelten Bewertungsskala. Es ist dafür zu sorgen, daß die Beobachtungsbedingungen möglichst konstant bleiben. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere beziehen auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie auf autonome Reaktionen (z. B. Tränenfluß, Piloerektion, Pupillengröße, anormale Atmung). Gang-, und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf den Umgang mit den Tieren sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen) oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten auch dokumentiert werden (1).

Ophthalmologische Untersuchungen unter Verwendung eines Ophthalmoskops oder eines entsprechenden geeigneten Geräts sollten vorgenommen werden, bevor die Prüfsubstanz verabreicht wird, sowie zum Abschluß der Studie, vorzugsweise an allen Tieren, doch zumindest in den höchstdosierten Gruppen und den Kontrollgruppen. Sofern Veränderungen an den Augen beobachtet werden, sollten alle Tiere untersucht werden.

Zum Ende des Expositionszeitraums, jedenfalls nicht früher als in der 11. Woche, sollten sensorische Reaktionen auf Reize verschiedener Art (1) (z.B. akustische, visuelle und propriozeptive Reize) (2), (3), (4), sowie die Greifstärke (5) und die motorische Aktivität (6) erfasst werden. Weitere Einzelheiten zu den möglichen Untersuchungen finden sich in der Literatur. Allerdings können auch andere als dort genannte Verfahren angewendet werden.

Funktionelle Beobachtungen zum Abschluß der Studie können entfallen, wenn Daten über funktionelle Beobachtungen aus anderen Studien vorliegen und die täglichen klinischen Beobachtungen keine Funktionsdefizite aufweisen.

In Ausnahmefällen können funktionelle Beobachtungen auch bei Gruppen entfallen, die so starke sonstige Toxizitätsanzeichen aufweisen, daß die Leistungen in Funktionstests dadurch signifikant beeinträchtigt würden.

### 1.5.2.1 *Körpergewicht und Futter-/Wasseraufnahme*

Alle Tiere sollten mindestens einmal wöchentlich gewogen werden. Messungen der Futterraufnahme sollten mindestens wöchentlich vorgenommen werden. Wenn die Prüfsubstanz über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Wasseraufnahme kann auch in Fütterungsstudien oder in Studien mit Sondenapplikation berücksichtigt werden, bei denen sich das Trinkverhalten ändern kann.

### 1.5.2.2 *Hämatologische und klinisch-biochemische Untersuchungen*

Die Blutproben sind an einer zu benennenden Stelle zu entnehmen und möglichst unter geeigneten Bedingungen zu lagern. Am Ende des Prüfzeitraums werden bei den Versuchstieren Blutproben kurz vor der Tötung oder als Teil des Tötungsvorgangs entnommen.

Folgende hämatologische Untersuchungen sind am Ende des Prüfzeitraums und bei etwaigen zwischenzeitlich entnommenen Blutproben durchzuführen: Hämatokritwert, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl (Gesamt- und Differentialblutbild), Thrombozytenzahl und Messung der Blutgerinnungszeit/Blutgerinnungsfähigkeit.

Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben erfolgen, die von jedem Tier unmittelbar vor der Tötung oder als Teil des Tötungsvorgangs entnommen werden (dies gilt nicht für Tiere, die sterbend aufgefunden und/oder zwischenzeitlich getötet werden). Vergleichbar zu den hämatologischen Untersuchungen können klinisch-biochemische Untersuchungen bei den zwischenzeitlich entnommenen Blutproben durchgeführt werden. Es empfiehlt sich eine Futterkarenz der Tiere über Nacht, bevor die Blutproben entnommen werden. <sup>(1)</sup> Die Plasma- oder Serumbestimmungen umfassen die Parameter Natrium, Kalium, Glukose, Gesamtcholesterin, Harnstoff, Harnstoff-Stickstoff im Blut, Kreatinin, Gesamtprotein und Albumin sowie mehr als zwei Enzyme, die auf hepatozelluläre Wirkungen (wie Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, alkalische Phosphatase, Gammaglutamyl-Transpeptidase und Sorbitoldehydrogenase) schließen lassen. Ferner kann die Bestimmung weiterer Enzyme (der Leber oder sonstiger Organe) und der Gallensäuren, die unter bestimmten Bedingungen ebenfalls nützliche Informationen liefern, durchgeführt werden.

Zusätzlich(Optional?) können in der letzten Woche der Studie am Urin, der zu festgelegten Zeiten gesammelt wird, folgende Analysebestimmungen durchgeführt werden: Aussehen, Volumen, Osmolalität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Eiweiß, Glukose und Blut/Blutzellen.

Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebsschädigung erwogen werden. Des Weiteren sollten, wenn die bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz die entsprechenden Stoffwechselprofile beeinträchtigen können oder wenn mit einer solchen Beeinträchtigung zu rechnen ist, die Parameter Calcium, Phosphor, Nüchtern-triglyzeride, spezifische Hormone, Methämoglobin und Cholinesterase bestimmt werden. Die jeweiligen Parameter sind je nach Prüfsubstanzklasse bzw. von Fall zu Fall zu bestimmen.

Insgesamt jedoch ist je nach der Versuchstierart und den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen.

Bei unzureichender Datenlage zu den Normalwerten, sollte die Bestimmung hämatologischer und klinisch-biochemischer Parameter gegebenenfalls auch vor Verabreichung der Prüfsubstanz erwogen werden. In der Regel empfiehlt es sich nicht, diese Daten vor der Behandlung zu bestimmen (7).

---

(1) Für eine Reihe von Serum- und Plasmabestimmungen, insbesondere der Glukose, ist eine Futterkarenz der Tiere über Nacht zu empfehlen. Der Hauptgrund dafür ist, daß die bei fehlender Futterkarenz unweigerlich zunehmende Variabilität zu einer Maskierung subtilerer Wirkungen führen und die Interpretation erschweren könnte. Andererseits könnte jedoch eine nächtliche Futterkarenz den allgemeinen Stoffwechsel der Tiere, insbesondere in Futterstudien, die tägliche Exposition gegenüber der Prüfsubstanz beeinträchtigen. Wenn man sich für die nächtliche Futterkarenz entscheidet, sollten die klinisch-biochemischen Parameter nach Durchführung der funktionellen Beobachtungen der Studie bestimmt werden.

### 1.5.2.3 *Autopsie*

Alle an der Studie beteiligten Tiere müssen einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen werden, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfaßt. Leber, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nebenhoden, Uterus, Eierstöcke, Thymus, Milz, Gehirn und Herz aller Tiere (außer der tot aufgefundenen und/oder zwischenzeitlich getöteten Tiere) sind in angemessener Form von anhaftendem Gewebe zu befreien, und ihr Naßgewicht ist so rasch wie möglich nach der Sektion festzustellen, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die folgenden Gewebe sind in dem für Gewebsarten und die vorgesehene nachfolgende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmedium aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Läsionen, Gehirn (repräsentative Bereiche, insbesondere Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons), Rückenmark (auf drei Ebenen: cervical, mittlerer Thoraxbereich, und lumbar), Hypophyse, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Thymusdrüse, Speiseröhre, Speicheldrüsen, Magen, Dünn- und Dickdarm (einschließlich Peyer'schen Platten), Leber, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Luftröhre und Lungen (durch Inflation mit Fixiermittel und anschließende Immersion konserviert), Aorta, Gonaden, Uterus akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüsen, Prostata, Harnblase, Gallenblase (Maus), Lymphknoten (vorzugsweise ein Lymphknoten des Verabreichungsweges und ein weiterer vom Verabreichungsweg entfernter Lymphknoten, um systemische Wirkungen abzudecken), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis), vorzugsweise in der Nähe des Muskels, ein Knochenmarksschnitt (und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat) Haut und Augen (sofern bei den ophthalmologischen Untersuchungen Veränderungen beobachtet wurden). Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebsuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als wahrscheinliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.

### 1.5.2.4 *Histopathologische Untersuchungen*

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosis sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine umfassende histopathologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere aller anderen Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden.

Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen.

Umfaßt eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen toxische Wirkungen aufgetreten sind.

## 2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### 2.1 **DATEN**

Es sollten Daten für jedes einzelne Tier vorgelegt werden. Außerdem sollten alle Daten in Tabellenform zusammengefaßt werden, aus denen für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Gründen des Tierschutzes getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des eingetretenen Todes oder der aus Tierschutzgründen vorgenommenen Tötung, die Zahl der Tiere, die Anzeichen von Toxizität aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und der Prozentsatz der davon betroffenen Tiere.

Wenn möglich sind die numerischen Daten durch eine geeignete allgemein annehmbare statistische Methode auszuwerten. Die statistischen Methoden und die zu analysierenden Daten sollten bei der Planung der Studie festgelegt werden.

## 2.2 PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß folgende Angaben enthalten:

### 2.2.1 **Prüfsubstanz:**

- physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Identifizierungsdaten;
- Vehikle (sofern zutreffend): Begründung der Wahl des Vehikle, sofern anders als Wasser.

### 2.2.2 **Vesuchstierart:**

- Tierart und Stamm;
- Zahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- individuelles Gewicht der Tiere zu Beginn der Prüfung.

### 2.2.3 **Prüfbedingungen:**

- Begründung der Wahl der Dosisstufen;
- Einzelheiten der Formulierung der Prüfsubstanz/Futterzubereitung, erzielte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- tatsächliche Dosen (mg/kg Körpergewicht/Tag) und, sofern zutreffend, Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Trinkwasser (ppm) in die tatsächliche Dosis;
- Einzelheiten der Futter- und Wasserqualität.

### 2.2.4 **Ergebnisse:**

- Körpergewicht und Änderungen des Körpergewichts;
- gegebenenfalls Angaben zur Futter- und Wasseraufnahme;
- Daten der toxischen Wirkung nach Geschlecht und Dosis, einschließlich Toxizitätsanzeichen;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- Ergebnisse aus der ophthalmologische Untersuchung;
- Bewertung der Sensorik, Greifstarke und motorische Aktivität (sofern zutreffend);
- hämatologische Tests mit entsprechenden Normalwerten;
- klinisch- biochemische Tests mit entsprechenden Normalwerten;
- terminales Körpergewicht, Organgewichte und Verhältnis Organ-/Kör;
- Sektionsbefunde;
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, wenn möglich.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

3. **LITERATUR**

- (1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, 691-704.
- (4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267-283.
- (5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxivol.*, 1, 233-236.
- (6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599-609.
- (7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). "Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies", *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, 198-201.

## B.27. PRÜFUNG AUF SUB-CHRONISCHE ORALE TOXIZITÄT

### 90-TAGE-TOXIZITÄSTUDIE BEI WIEDERHOLTER ORALER VERABREICHUNG AN NICHT-NAGETIEREN

#### 1. METHODE

Diese Methode zur Prüfung auf subchronische orale Toxizität entspricht der OECD TG 409 (1998).

#### 1.1 EINLEITUNG

Bei der Beurteilung und Bewertung der toxischen Merkmale eines chemischen Stoffs kann die Bestimmung der subchronischen Toxizität bei wiederholter oraler Verabreichung von Wirkstoffgaben durchgeführt werden, nachdem erste Toxizitätsdaten anhand von Prüfungen auf akute Toxizität oder 28-Tage-Tests auf Toxizität bei wiederholter Verabreichung erzielt wurden. Die 90-Tage-Studie liefert Informationen über mögliche gesundheitliche Schädigungen, die durch wiederholte Exposition über einen Zeitraum des schnellen Wachstums bis zum frühen Stadium des Erwachsenseins entstehen können. Die Studie liefert ferner Informationen über die wichtigsten toxischen Wirkungen, zeigt die Zielorgane und eine mögliche Akkumulation auf und kann zur Ableitung einer NOAEL (NOAEL – Dosis ohne beobachtete schädigende Wirkung) beitragen, die zur Wahl der Dosierungen für Untersuchungen der chronischen Toxizität und zur Festlegung von Sicherheitskriterien für die Humanexposition herangezogen werden kann.

Die Prüfmethode soll dazu beitragen, die schädigenden Wirkungen einer Exposition gegenüber Chemikalien bei Nicht-Nagetieren festzustellen und sollte nur in folgenden Fällen angewandt werden:

- wenn in anderen Studien beobachtete Wirkungen eine Klärung/Charakterisierung an einer zweiten Tierart, den Nicht-Nagetieren, erforderlich machen;
- wenn toxikokinetische Studien darauf hindeuten, daß die Verwendung einer spezifischen Art von Nicht-Nagetieren die relevanteste Wahl von Versuchstieren ist, oder
- wenn andere spezifische Gründe die Verwendung einer Nicht-Nagetierart rechtfertigen.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Dosis** ist die Menge der verabreichten Prüfsubstanz. Die Dosis wird als Gewicht (g, mg) oder als Gewicht der Prüfsubstanz je Gewichtseinheit des Versuchstiers (z.B. mg/kg) oder als konstante Futterkonzentration (ppm) ausgedrückt.

**Dosierung** ist ein allgemeiner Begriff, der die Dosis, ihre Häufigkeit und die Dauer der Verabreichung umfaßt.

**NOAEL** ist die Abkürzung für *no-observed adverse effect level* und entspricht der höchsten Dosis, bei der keine schädigenden behandlungsbedingten Wirkungen festgestellt werden.

#### 1.3 PRINZIP DER METHODE

Die Prüfsubstanz wird täglich über einen Zeitraum von 90 Tagen in abgestuften Dosen an mehrere Gruppen von Versuchstieren verabreicht, und zwar eine Dosisstufe je Gruppe. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere sorgfältig auf Toxizitätsanzeichen beobachtet. Während der Prüfung verendete oder getötete Tiere werden sezirt. Am Ende der Prüfung werden alle noch lebenden Tiere getötet und ebenfalls sezirt.

## 1.4 BESCHREIBUNG DER METHODE

### 1.4.1 **Auswahl von Versuchstierarten**

Die am häufigsten verwendete Nicht-Nagetierart ist der Hund, der einer bestimmten Rasse angehören sollte. Häufig wird der Beagle verwendet. Ferner können Tierarten wie Schwein oder Minischwein verwendet werden. Primaten werden nicht empfohlen, und ihre Verwendung ist zu begründen. Es sollten junge und gesunde Tiere verwendet werden. Bei Hunden sollte mit der Dosierung vorzugsweise im Alter von vier bis sechs Monaten, jedoch nicht später als neun Monaten begonnen werden. Wird die Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität durchgeführt, sollten in beiden Studien dieselbe Art/Rasse verwendet werden.

### 1.4.2 **Vorbereitung der Tiere**

Zu verwenden sind gesunde Jungtiere, die an die Laborbedingungen gewöhnt und bisher nicht für Tierversuche verwendet wurden. Die Dauer der Gewöhnung hängt von der für die Prüfung gewählten Art und der Herkunft der Tiere ab. Empfohlen werden mindestens fünf Tage für Hunde oder für speziell zu diesem Zweck gezüchtete Schweine aus einer internen Kolonie und mindestens zwei Wochen für Tiere externer Herkunft. Von den Versuchstieren sollten Art, Stamm, Herkunft, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter festgestellt werden. Die Tiere werden nach dem Zufallsprinzip in Kontroll- und Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Käfige sind so aufzustellen, daß etwaige durch den Standort bedingte Auswirkungen möglichst gering sind. Jedes Versuchstier sollte zur sicheren Identifizierung eine eigene Nummer erhalten.

### 1.4.3 **Zubereitung der Dosen**

Die Prüfsubstanz wird mit dem Futter oder im Trinkwasser über eine Magensonde oder in Kapseln verabreicht. Die Methode der oralen Verabreichung hängt von dem Zweck der Studie und den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Prüfmaterials ab.

Bei Bedarf wird die Prüfsubstanz in einem geeigneten Medium gelöst oder suspendiert. Es empfiehlt sich, nach Möglichkeit zunächst die Verwendung einer wässrigen Lösung/Suspension, sodann eine Lösung/Emulsion in Öl (z.B. Maisöl) und erst dann eine Lösung in anderen Medien in Betracht zu ziehen. Bei anderen Medien als Wasser müssen seine toxischen Merkmale bekannt sein. Die Stabilität der Prüfsubstanz unter den Verabreichungsbedingungen ist festzustellen.

## 1.5 VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

### 1.5.1 **Zahl und Geschlecht der Versuchstiere**

Für jede Dosisstufe sind mindestens acht Tiere (vier weibliche und vier männliche) zu verwenden. Sollten im Verlauf der Prüfung Tiere getötet werden, ist die Zahl der Tiere um die Zahl zu erhöhen, die bereits vor Abschluß der Studie getötet werden sollen. Die Zahl der Tiere bei Beendigung der Studie muß für eine sinnvolle Bewertung der toxischen Wirkungen angemessen sein. Aufgrund bereits bekannter Wirkungen der Substanz oder eines eng verwandten Analogons sollte darüber hinaus für die Kontrollgruppe und die Gruppe mit der höchsten Dosis die Aufnahme einer Satellitengruppe von acht Tieren (vier jeden Geschlechts) zwecks Behandlung und anschließender Beobachtung der Reversibilität oder Persistenz etwaiger toxischer Wirkungen erwogen werden. Die Dauer dieses Zeitraums nach der Behandlung sollten den beobachteten Wirkungen angemessen sein.



### 1.5.2 **Dosierung**

Es sollten mindestens drei Dosierungen und eine gleichzeitige Kontrolle verwendet werden, es sei denn, ein Limit-Test wird durchgeführt (s. 1.4.3.4). Die Dosierungen können auf der Grundlage der Ergebnisse von Studien mit wiederholter Verabreichung oder Studien zur Ermittlung des Dosisbereichs festgelegt werden und sollten sämtliche für die Prüfsubstanz oder verwandte Materialien verfügbaren toxikologischen und toxikokinetischen Daten berücksichtigen. Außer wenn dies wegen der physikalisch-chemischen Eigenschaften oder der biologischen Wirkungen der Prüfsubstanz unmöglich ist, sollte die höchste Dosierung gewählt werden, um Toxizität, jedoch nicht Tod oder schweres Leiden der Tiere zu induzieren. Zum Nachweis dosisabhängiger Reaktionen und einer NOAEL bei niedrigster Dosierung, sollten die Dosierungen in absteigender Folge verabreicht werden. Zwei- bis vierfache Abstände haben sich oft als optimale Dosisabstufungen erwiesen, auch ist meist eine vierte Testgruppe der Anwendung sehr großer Dosisabstände (z.B. mehr als ein Faktor von ca. 6-10) vorzuziehen.

Die Kontrollgruppe sollte eine unbehandelte Gruppe oder eine Vehikel-Kontrollgruppe sein, sofern ein Vehikel zur Verabreichung der Prüfsubstanz verwendet wird. Abgesehen von der Behandlung mit der Prüfsubstanz sollten die Tiere der Kontrollgruppe identisch mit denen der Testgruppen behandelt werden. Wird ein Vehikel verwendet, erhält die Kontrollgruppe das Vehikel im höchsten verwendeten Volumen. Wird eine Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht, und führt dies zu einer verminderten Futteraufnahme, kann eine paarweise gefütterte Kontrollgruppe nützlich sein, wobei zwischen einer verminderten Futteraufnahme aus geschmacklichen Gründen oder wegen toxikologischer Veränderungen im Prüfmodell unterschieden wird.

Zu berücksichtigen sind gegebenenfalls folgende Merkmale des Vehikel und anderer Additive: Wirkungen auf die Absorption, die Verteilung, den Stoffwechsel oder die Retention der Prüfsubstanz; Wirkungen auf die chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz, die zur Änderung von toxischen Eigenschaften führen können kann; ferner Wirkungen auf die Futter- oder Wasseraufnahme oder den Ernährungszustand der Versuchstiere.

### 1.5.3 **Limit-Test**

Ergibt eine Prüfung bei einer einzigen Dosis von mindestens 1000 mg/kg Körpergewicht/Tag unter Anwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine adversen Effekte und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Stoffe keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie mit drei Dosisstufen gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test ist anzuwenden, außer wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung bei einer höheren Dosis erforderlich erscheinen läßt.

### 1.5.4 **Verabreichung der Dosen**

Die Versuchstiere erhalten die Prüfsubstanz an sieben Tagen der Woche über einen Zeitraum von 90 Tagen. Jede Abweichung von diesem Dosierungsplan, z. B. fünf Tage je Woche, ist zu begründen. Wird die Prüfsubstanz über eine Sonde verabreicht, so sollte dies in einer einmaligen Dosis unter Verwendung einer Magensonde oder einer geeigneten Intubationskanüle erfolgen. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das einem Versuchstier mit einer Gabe verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstiers ab. Generell sollte das Volumen möglichst gering sein. Außer für Reizungen auslösende oder ätzende Stoffe, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine Verschlimmerung bewirken, sollte die Variabilität des Prüfvolumens durch Anpassung der Konzentration möglichst gering gehalten werden, um ein konstantes Volumen bei allen Dosen zu gewährleisten.

Für mit dem Futter oder dem Trinkwasser verabreichte Stoffe ist unbedingt sicherzustellen, daß die Mengen der jeweiligen Prüfsubstanz die normale Nahrungsaufnahme oder den Wasserhaushalt nicht beeinträchtigen. Wenn die Prüfsubstanz mit dem Futter verabreicht wird, können entweder eine konstante Futterkonzentration (ppm) oder eine konstante Dosierung in Relation zum Körpergewicht verwendet werden. Jede angewandte Alternative ist zu spezifizieren. Eine mit einer Magensonde oder in Kapseln verabreichte Substanz sollte jeweils zu denselben Tageszeiten gegeben und so angepaßt werden, daß eine konstante Dosis in Relation zum Körpergewicht aufrechterhalten bleibt. Wird eine 90-Tage-Studie als Vorstudie für eine Langzeitstudie über chronische Toxizität verwendet, sollte in beiden Studien die gleiche Nahrung verabreicht werden.

### 1.5.5 **Beobachtungen**

Der Beobachtungszeitraum sollte mindestens 90 Tage betragen. Tiere einer Satellitengruppe, die für Nachfolgebeobachtungen vorgesehen sind, sollten für einen angemessenen Zeitraum ohne Behandlung bleiben, um festzustellen, ob die toxischen Wirkungen fortbestehen oder sich als reversibel erweisen.

Allgemeine klinische Beobachtungen sollten mindestens einmal täglich, vorzugsweise zur selben Tageszeit, unter Berücksichtigung des Zeitraums, in dem der Wirkungsgipfel nach Verabreichung der Dosis zu erwarten ist, vorgenommen werden. Der klinische Zustand der Tiere ist zu dokumentieren. Alle Tiere sind mindestens zweimal täglich, in der Regel morgens und abends, auf Anzeichen von Morbidität und Mortalität hin zu untersuchen.

Mindestens einmal vor der ersten Exposition (für intraindividuelle Vergleiche) und danach einmal pro Woche sollten bei allen Tieren umfassende klinische Beobachtungen vorgenommen werden. Diese Beobachtungen sollten, sofern praktisch durchführbar, außerhalb des Käfigs erfolgen, in dem die Tiere gehalten werden, und zwar vorzugsweise in einem Standardgehege jeweils zu denselben Zeiten. Die Beobachtungsbedingungen sollten möglichst konstant sein. Anzeichen von Toxizität sind sorgfältig zu dokumentieren, insbesondere Beginn, Schweregrad und Dauer. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere beziehen auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, auf Sekrete und Exkrete sowie auf autonome Reaktionen (z. B. Tränenfluß, Piloerektion, Pupillengröße, anormale Atmung). Gang- und Haltungsstörungen, ferner Reaktionen auf den Umgang mit den Tieren sowie etwaige klonische oder tonische Bewegungen, Stereotypien (z. B. übermäßiges Putzen, wiederholte Kreisbewegungen) oder abnormes Verhalten (z. B. Selbstverstümmelung, Rückwärtsgehen) sollten auch dokumentiert werden.

Ophthalmologische Untersuchungen unter Verwendung eines Ophthalmoskops oder eines entsprechenden geeigneten Geräts sollten vorgenommen werden, bevor die Prüfsubstanz verabreicht wird, sowie zum Abschluß der Studie, vorzugsweise an allen Tieren, zumindest jedoch in den höchstdosierten Gruppen und den Kontrollgruppen. Sofern behandlungsbedingte Veränderungen an den Augen beobachtet werden, sollten alle Tiere untersucht werden.

#### 1.5.5.1 *Körpergewicht und Futter-/Wasseraufnahme*

Alle Tiere sollten mindestens einmal wöchentlich gewogen werden. Messungen der Futtermittelaufnahme sollten mindestens wöchentlich vorgenommen werden. Wenn die Prüfsubstanz über das Trinkwasser verabreicht wird, sollte auch die Wasseraufnahme mindestens einmal wöchentlich gemessen werden. Die Wasseraufnahme kann auch in Fütterungsstudien oder in Studien mit Sondenapplikation berücksichtigt werden, bei denen sich das Trinkverhalten ändern kann.

#### 1.5.5.2 *Hämatologische und klinisch-biochemische Untersuchungen*

Die Blutproben sind an einer zu benennenden Stelle zu entnehmen und möglichst unter geeigneten Bedingungen zu lagern. Am Ende des Prüfzeitraums werden bei den Versuchstieren Blutproben kurz vor der Tötung oder als Teil des Tötungsvorgangs entnommen.

Hämatologische Untersuchungen sind zu Beginn der Studie und anschließend entweder monatlich oder zur Halbzeit und schließlich am Ende des Prüfzeitraums vorzunehmen: Hämatokritwert, Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl (Gesamt- und Differentialblutbild), Thrombozytenzahl und Bestimmung des Gerinnungspotentials, wie Gerinnungszeit, Prothrombinzeit oder Thromboplastinzeit.

Klinisch-biochemische Bestimmungen zur Untersuchung der wichtigsten toxischen Wirkungen in Geweben, insbesondere der Wirkungen auf Nieren und Leber, sind an Blutproben durchzuführen, die von jedem Tier zu Beginn und anschließend entweder monatlich oder zur Halbzeit und schließlich am Ende des Prüfzeitraums entnommen werden. Die Prüfungen sollten folgende Bereiche abdecken: Elektrolythaushalt, Kohlehydratstoffwechsel sowie Leber- und Nierenfunktion. Die Wahl der spezifischen Prüfungen hängt von den Beobachtungen über die Wirkungsweise der Prüfsubstanz ab. Vor der Blutentnahme empfiehlt sich eine der Tierart angemessene Futterkarenz. Es wird empfohlen, Bestimmungen insbesondere für folgende Parameter durchzuführen: Calcium, Phosphor, Chlor, Natrium, Kalium, Nüchtern glukose, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Ornithindecaboxylase, Gamma-glutamyl-Transpeptidase, Harnstoff-Stickstoff, Albumin, Blutkreatinin, Gesamtbilirubin und Messungen des Serum-Gesamtproteins.

Untersuchungen zur Urinanalyse sind zumindest zu Beginn, anschließend zur Halbzeit und schließlich zum Abschluß der Studie an zu festgelegten Zeiten gesammeltem Urin durchzuführen: Aussehen, Volumen, Osmolarität oder spezifisches Gewicht, pH-Wert, Glukose und Blut/Blutzellen. Sofern erforderlich, können zusätzliche Parameter verwendet werden, um die Untersuchung beobachteter Wirkungen zu erweitern.

Darüber hinaus sollten Untersuchungen zur Bestimmung von Serummarkern für eine allgemeine Gewebsschädigung erwogen werden. Sonstige Bestimmungen, die für eine angemessene toxikologische Bewertung erforderlich sein können, umfassen Analysen von Lipiden, Hormonen, Säure-/Basengleichgewicht, Methämoglobin und Cholinesteraseinhibition. Weitere klinisch-biochemische Untersuchungen können, sofern erforderlich, durchgeführt werden, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu erweitern. Die jeweiligen Parameter sind je nach Prüfsubstanzklasse bzw. von Fall zu Fall zu bestimmen.

Insgesamt ist je nach Versuchstierart und den beobachteten und/oder erwarteten Wirkungen der Prüfsubstanz mit der entsprechenden Flexibilität vorzugehen.

#### 1.5.5.3 *Autopsie*

Alle an der Studie beteiligten Tiere müssen einer vollständigen, eingehenden Autopsie unterzogen werden, die die sorgfältige Untersuchung der äußeren Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel-, Brust- und Bauchhöhlen und ihres Inhalts umfaßt. Leber und Gallenblase, Nieren, Nebennieren, Hoden, Nebenhoden, Uterus, Eierstöcke, Schilddrüse, (mit Nebenschilddrüse), Thymus, Milz, Gehirn und Herz aller Tiere (außer der tot aufgefundenen und/oder zwischenzeitlich getöteten Tiere) sind in angemessener Form von anhaftendem Gewebe zu befreien, und ihr Naßgewicht ist so rasch wie möglich nach der Sektion festzustellen, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die folgenden Gewebe sind in dem für Gewebsarten und die vorgesehene nachfolgende histopathologische Untersuchung am besten geeigneten Fixierungsmedium aufzubewahren: alle Gewebe mit makroskopischen Läsionen, Gehirn (repräsentative Bereiche, insbesondere Cerebrum, Cerebellum und Medulla/Pons), Rückenmark (auf drei Ebenen: cervical, mittlerer Thoraxbereich, und lumbar), Hypophyse, Augen, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Thymusdrüse, Speiseröhre, Speicheldrüsen, Magen, Dünn- und Dickdarm (einschließlich Peyer'schen Platten), Leber, Gallenblase, Bauchspeicheldrüse, Nieren, Nebennieren, Milz, Herz, Luftröhre und Lungen, Aorta, Gonaden, Uterus akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüsen, Prostata, Harnblase, Lymphknoten (vorzugsweise ein Lymphknoten des Verabreichungsweges und ein weiterer vom Verabreichungsweg entfernter, um systemische Wirkungen abzudecken), periphere Nerven (N. ischiadicus oder N. tibialis), vorzugsweise in der Nähe des Muskels, ein Knochenmarksschnitt (und/oder ein frisches Knochenmark-Aspirat) und Haut. Die klinischen und sonstigen Befunde können weitere Gewebsuntersuchungen erforderlich machen. Auch Organe, die aufgrund der bekannten Eigenschaften der Prüfsubstanz als mögliche Zielorgane in Frage kommen, sollten aufbewahrt werden.

#### 1.5.5.4 *Histopathologische Untersuchungen*

Bei allen Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosis sowie bei den Tieren der Kontrollgruppe ist eine umfassende histopathologische Untersuchung der konservierten Organe und Gewebe durchzuführen. Diese Untersuchungen sind auch auf die Tiere aller Dosisgruppen auszudehnen, wenn behandlungsbedingte Veränderungen in der Gruppe mit der höchsten Dosis festgestellt werden.

Alle makroskopischen Läsionen sind zu untersuchen.

Umfaßt eine Prüfung auch eine Satellitengruppe, sind bei den Tieren dieser Gruppe die Gewebe und Organe histopathologisch zu untersuchen, bei denen in den Behandlungsgruppen Wirkungen aufgetreten sind.

## 2. **DATEN UND BERICHTERSTATTUNG**

### 2.1 DATEN

Es sollten Daten für jedes einzelne Tier vorgelegt werden. Außerdem sollten alle Daten in Tabellenform zusammengefaßt werden, aus denen für jede Prüfgruppe folgende Daten hervorgehen: die Zahl der Tiere bei Beginn der Prüfung und die Zahl der während der Prüfung tot aufgefundenen oder aus Gründen des Tierschutzes getöteten Tiere, ferner der Zeitpunkt des eingetretenen Todes oder der aus Tierschutzgründen vorgenommenen Tötung, die Zahl der Tiere, die Anzeichen von Toxizität aufweisen, eine Beschreibung der beobachteten Toxizität, einschließlich des Zeitpunkts, zu dem die toxischen Wirkungen erstmalig aufgetreten sind, deren Dauer und Schweregrad, die Zahl der Tiere mit Läsionen, die Art der Läsionen und der Prozentsatz der davon betroffenen Tiere.

Wenn möglich sind die numerischen Daten durch eine geeignete allgemein annehmbare statistische Methode auszuwerten. Die statistischen Methoden und die zu analysierenden Daten sollten bei der Planung der Studie festgelegt werden.

### 2.2 PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß folgende Informationen enthalten:

#### 2.2.1 **Prüfsubstanz:**

- physikalische Beschaffenheit, Reinheit und physikalisch-chemische Eigenschaften;
- Identifizierungsdaten;
- Vehikel (sofern zutreffend): Begründung der Wahl des Vehikel, sofern anders als Wasser.

#### 2.2.2 **Versuchstierart:**

- Tierart und Stamm;
- Zahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- individuelles Gewicht der Tiere zu Beginn der Prüfung.

#### 2.2.3 **Prüfbedingungen:**

- Begründung der Wahl der Dosisstufen;
- Einzelheiten der Formulierung der Prüfsubstanz/Futterzubereitung, erzielte Konzentration, Stabilität und Homogenität der Zubereitung;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- tatsächliche Dosen (mg/kg Körpergewicht/Tag) und, sofern zutreffend, Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Trinkwasser (ppm) in die tatsächliche Dosis;
- Einzelheiten der Futter- und Wasserqualität.

#### 2.2.4

##### **Ergebnisse:**

- Körpergewicht und Änderungen des Körpergewichts;
- gegebenenfalls Angaben zur Futter-und Wasseraufnahme;
- Daten der toxischen Wirkung nach Geschlecht und Dosis, einschließlich Toxizitätsanzeichen;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- Ergebnisse aus der ophthalmologische Untersuchung;
- hämatologische Tests mit entsprechenden Normalwerten;
- klinisch-biochemische Tests mit entsprechenden Normalwerten;
- terminales Körpergewicht, Organgewichte und Verhältnis Organ-/Körpergewicht;
- Sektionsbefunde;
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- Abortionsdaten, sofern zutreffend;
- statistische Bearbeitung der Ergebnisse, wenn möglich.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen

## B. 28

### PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT NACH DERMALER APPLIKATION

#### 90-TAGE-TEST MIT NAGERN

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird mehreren Versuchstiergruppen täglich in abgestuften Dosierungen auf die Haut aufgetragen, und zwar eine Dosierung je Gruppe über einen Zeitraum von 90 Tagen. Während des Verabreichungszeitraums werden die Tiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden seziiert.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt. Kurz vor Beginn des Tests wird das Rückenfell der Versuchstiere geschoren. Ein Abrasieren des Fells ist ebenfalls möglich, sollte jedoch etwa 24 Stunden vor dem Versuch erfolgen. Das Scheren oder Rasieren muß normalerweise wöchentlich wiederholt werden. Es ist darauf zu achten, daß dabei die Haut nicht verletzt wird. Mindestens 10 % der Körperoberfläche wird für die Applikation der Prüfsubstanz vorbereitet. Bei der Bestimmung des zu scherenen Bereichs und der Applikationsfläche ist das Gewicht der Tiere zu berücksichtigen. Werden Versuche mit festen Stoffen durchgeführt, die ggf. pulverisiert werden können, sollte die Prüfsubstanz ausreichend mit Wasser oder, falls erforderlich, mit einem geeigneten Vehikel angefeuchtet werden, um einen guten Kontakt mit der Haut zu gewährleisten. Flüssige Prüfsubstanzen werden gewöhnlich unverdünnt angewendet. Die Applikation erfolgt normalerweise an fünf bis sieben Tagen pro Woche.

###### *Versuchsbedingungen*

###### *Versuchstiere*

Es können erwachsene Ratten, Kaninchen oder Meerschweinchen verwendet werden. Andere Tierarten sind ebenfalls geeignet, jedoch muß ihre Verwendung begründet werden. Zu Beginn des Versuchs sollte die Abweichung im Körpergewicht nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische dermale Toxizitätsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

###### *Anzahl und Geschlecht*

Mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche) mit gesunder Haut sind für jede Dosierung zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 20 Tieren (10 Tiere pro Geschlecht) über 90 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden, um während eines Zeitraums von 28 Tagen nach der Behandlung auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen achten zu können.

## Dosierungen

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe und — sofern ein Vehikel benutzt wird — eine Vehikel-Kontrollgruppe erforderlich. Die Applikation der Prüfsubstanz sollte täglich zur gleichen Zeit und in festgesetzten Intervallen (wöchentlich oder vierzehntäglich) erfolgen, um ein in Relation zum Körpergewicht des Tieres konstantes Dosierungsniveau zu gewährleisten. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere.

Wird zur Erleichterung der Verabreichung ein Vehikel benutzt, so ist dieses der entsprechenden Kontrollgruppe in gleicher Weise zu verabreichen wie den behandelten Tieren und zwar in der Menge, die die Gruppe mit der höchsten Dosierung erhält. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß auf jeden Fall toxische Wirkungen eintreten, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so sollte die niedrigste Dosierung diesen Wert nicht überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischendosierungen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß sich eine graduelle Abstufung der toxischen Wirkungen ergibt. In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Dosierung sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Führt die Applikation der Prüfsubstanz zu schweren Hautreizungen, sollten die Konzentrationen herabgesetzt werden, was bei hoher Dosierung zu einer Verminderung oder einem Ausbleiben weiterer toxischer Wirkungen führen dürfte. Wurde die Haut stark beschädigt, ist es unter Umständen notwendig, den Versuch abzubrechen und mit einer niedrigeren Konzentration erneut zu beginnen.

## Limit-Test

Hat im Rahmen einer Vorstudie die Verabreichung einer Dosis von 1 000 mg/kg bzw. einer höheren Dosis, die einer bekannten Exposition beim Menschen entspricht, keine toxischen Auswirkungen, so ist eine weitere Prüfung nicht erforderlich.

## Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

## Versuchsdurchführung

Die Tiere sind in Einzelkäfigen zu halten; die Prüfsubstanz wird ihnen vorzugsweise an 7 Tagen pro Woche während eines Zeitraums von 90 Tagen verabreicht. Tiere einer Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 28 Tage ohne Behandlung gehalten werden, um die Reversibilität von toxischen Effekten bzw. deren Fortbestehen festzustellen. Die Expositionszeit beträgt 6 Stunden pro Tag.

Die Prüfsubstanz ist gleichmäßig auf einen Bereich, der etwa 10 % der Körperoberfläche entspricht, aufzutragen. Bei hochtoxischen Substanzen kann die behandelte Oberfläche kleiner sein, es sollte jedoch ein möglichst großer Bereich mit einer möglichst dünnen und einheitlichen Schicht bedeckt werden.

Die Prüfsubstanz ist während der Expositionszeit mittels eines porösen Mullverbandes und eines hautschonenden Pflasters in Kontakt mit der Haut zu halten. Die Versuchsfläche ist außerdem auf eine geeignete Art abzudecken, um den Mullverband und die Prüfsubstanz zu fixieren und sicherzustellen, daß die Tiere die Prüfsubstanz nicht verschlucken können. Zu diesem Zweck können ggf. Mittel zur Einschränkung der Bewegungsfreiheit angewendet werden; eine vollständige Immobilisierung ist jedoch nicht zu empfehlen.

Nach Ablauf der Expositionszeit entfernt man — soweit möglich — den Rest der Prüfsubstanz mit Hilfe von Wasser oder eines anderen geeigneten Hautreinigungsverfahrens.

Alle Tiere müssen täglich beobachtet und Vergiftungssymptome sowie deren Beginn, Grad und Dauer aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und zentralen Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Futteraufnahme und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt. Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren während der Studie nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Nach Abschluß der Studie werden alle überlebenden Tiere, mit Ausnahme der Tiere der Satellitengruppe, seziert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziert werden.

Bei allen Tieren, einschließlich der Kontrolltiere, sind üblicherweise folgende Untersuchungen durchzuführen:

- a) eine ophthalmologische Untersuchung mit Hilfe eines Ophthalmoskops oder eines gleichwertigen geeigneten Gerätes sollte vor der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz und zum Abschluß der Studie — vorzugsweise bei allen Tieren, zumindest jedoch in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und in der Kontrollgruppe — durchgeführt werden. Sind bei Versuchsende Veränderungen der Augen feststellbar, sind alle Tiere zu untersuchen;

- b) am Ende des Versuches sind hämatologische Untersuchungen, einschließlich Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Differentialblutbild, Messungen der Gerinnungsfähigkeit, z. B. Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit oder Thrombozytenzahl, durchzuführen;
- c) am Ende des Versuches sind ebenfalls klinisch-chemische Untersuchungen des Blutes durchzuführen. Für diese Untersuchungen eignen sich folgende Analysen: Elektrolytbilanz, Kohlenhydratstoffwechsel, Leber- und Nierenfunktion. Die Durchführung spezifischer Analysen richtet sich nach der festgestellten Wirkungsweise der Prüfsubstanz. Vorgeschlagen werden folgende Bestimmungen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchtern glukose (mit auf die Tierart abgestimmter Fastenperiode), Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup>, Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase <sup>(2)</sup>, Ornithin-Dekarboxylase, Gamma-Glutamyltranspeptidase, Harnstickstoff, Albumin, Blut-Kreatinin, Gesamtbilirubin- und -Serumeiweißmessungen. Weitere Analysen, die gegebenenfalls für eine geeignete toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Lipide, Hormone, Säuren/Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität. Zusätzliche klinisch-chemische Analysen können erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu vertiefen;
- d) in der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, erscheint jedoch erforderlich, sofern eine toxische Wirkung zu erwarten oder zu beobachten ist.

Erweisen sich Daten aus vorangegangenen Versuchen als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter vor Versuchsbeginn in Betracht gezogen werden.

#### Autopsie

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen, einschließlich einer Untersuchung der Körperoberfläche, aller Körperöffnungen, sowie der Schädel, Brust- und Bauchhöhle einschließlich der jeweiligen Organe. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die folgenden Organe und Gewebe sind für eine eventuelle spätere histopathologische Untersuchung in einem geeigneten Medium aufzubewahren: alle Organe mit makroskopischen Veränderungen, Gehirn, einschließlich Medulla/Pons, der Kleinhirn- und Großhirnrinde, der Hypophyse, der Schilddrüse/Nebenschilddrüse, des Thymusgewebes, von Trachea und Lungen, Herz, Aorta, (Speicheldrüse), Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus, akzessorische Geschlechtsorgane, Gallenblase (sofern vorhanden), Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Rektum, Harnblase, repräsentative Lymphknoten (weibliche Brustdrüse), (Oberschenkelmuskulatur), Nerven des peripheren Systems, Brustbein mit Knochenmark (Augen), (Femur, einschließlich Gelenkoberfläche), (Wirbelsäule in drei Ebenen: Hals-, mittlerer Thorax- und Lendenbereich) sowie (extraorbitale Tränenrüse). Die in Klammern angegebenen Gewebe sind nur bei Anzeichen von Toxizität oder bei Einbeziehung des Zielorgans zu untersuchen.

#### Histopathologische Untersuchung

- a) Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit der höchsten Dosis ist eine vollständige histopathologische Untersuchung der behandelten und der unbehandelten Hautflächen sowie der Organe und Gewebe durchzuführen.
- b) Alle Organe mit makroskopischen Veränderungen sind zu untersuchen.
- c) Die Zielorgane der Tiere der anderen Dosisgruppen sind zu untersuchen.
- d) Werden Ratten benutzt, sind die Lungen der Tiere in der Gruppe mit niedriger und mittlerer Dosierung zur Feststellung einer möglichen Infektion histopathologisch zu untersuchen, daß eine geeignete Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere möglich ist. Weitere histopathologische Untersuchungen der Tiere dieser Gruppen sind routinemäßig nicht erforderlich, müssen jedoch bei den Tieren der Gruppe mit der höchsten Dosierung stets für alle geschädigten Organe durchgeführt werden.
- e) Bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe histopathologisch zu untersuchen, die in den behandelten Gruppen auf die Prüfsubstanz reagierten.

## 2.

#### DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderungen sowie der Prozentsatz der Tiere für jede Art der Veränderung, hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.



3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- nichttoxische Dosis, sofern möglich;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- ophthalmologische Befunde;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnis einer evtl. Urinanalyse);
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## B. 29

### PRÜFUNG AUF SUBCHRONISCHE TOXIZITÄT NACH INHALATION

#### 90-TAGE-TEST MIT NAGERN

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugsubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Mehrere Versuchstiergruppen werden der Prüfsubstanz täglich über einen bestimmten Zeitraum in abgestuften Konzentrationen ausgesetzt, wobei für jede Gruppe eine Konzentration zu verwenden ist. Wird ein Vehikel beigegeben, um die gewünschte Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen, ist eine Vehikel-Kontrollgruppe einzusetzen. Während des Versuchszeitraumes werden die Tiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet. Tiere, die während des Versuchs sterben, sowie die bei Versuchsende überlebenden Tiere werden sezziert.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und den einzelnen Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt. Falls notwendig, kann der Prüfsubstanz ein geeignetes Vehikel beigegeben werden, um die gewünschte Konzentration der Prüfsubstanz in der Atmosphäre herzustellen. Wird zur Vereinfachung der Dosierung ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz verwendet, muß dessen nichttoxische Wirkung gesichert sein. Dazu können gegebenenfalls Daten aus vorangegangenen Versuchen herangezogen werden.

###### *Versuchsbedingungen*

###### *Versuchstiere*

Soweit keine besonderen Gründe vorliegen, ist die Ratte zu bevorzugen. Es sind junge gesunde Tiere bekannter Versuchstierstämme zu verwenden. Die Schwankung im Körpergewicht sollte zu Beginn des Versuchs nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom anpassenden Mittelwert betragen. Wird eine subchronische Inhalationsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

###### *Anzahl und Geschlecht*

Mindestens 20 Tiere (10 weibliche und 10 männliche) sind für jede Versuchsgruppe zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen. Darüber hinaus kann eine zusätzliche Gruppe (Satellitengruppe) von 20 Tieren (10 Tiere pro Geschlecht) über 90 Tage mit der höchsten Dosierung behandelt werden, um während eines Zeitraums von 28 Tagen nach der Behandlung auf Reversibilität, Fortbestehen oder verzögertes Auftreten toxischer Wirkungen achten zu können.

#### Expositionskonzentration

Es sind mindestens drei Konzentrationen und eine Kontrollgruppe erforderlich; sofern ein Vehikel benutzt wird, ist eine zugehörige Kontrollgruppe (entsprechend der Konzentration des Vehikels bei der höchsten Expositionskonzentration) hinzuzuziehen. Abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe genauso zu behandeln wie die Versuchstiere. Die höchste Konzentration ist so zu wählen, daß auf jeden Fall eine toxische Wirkung eintritt, die Tiere jedoch nicht oder nur in geringer Zahl sterben. Die niedrigste Konzentration darf keine Anzeichen von Toxizität verursachen. Liegen brauchbare Schätzungen über die Höhe der Exposition beim Menschen vor, so muß die niedrigste Dosierung diesen Wert überschreiten. Nach Möglichkeit sollte die mittlere Dosierung nur geringe toxische Wirkungen verursachen. Werden mehrere Zwischenkonzentrationen verabreicht, so sollten sie so gewählt werden, daß sich eine graduelle Abstufung der toxischen Wirkungen ergibt. In den Gruppen mit niedriger und mittlerer Konzentration sowie in den Kontrollgruppen sollte die Anzahl von Todesfällen gering sein, um eine aussagekräftige Bewertung der Ergebnisse zu ermöglichen.

#### Expositionszeit

Die tägliche Expositionszeit sollte sechs Stunden betragen, wobei eine ausgeglichene Verteilung der Kammerkonzentration gewährleistet sein muß. Bei spezifischen Erfordernissen sind auch andere Expositionszeiten möglich.

#### Ausrüstung

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die einen dynamischen Luftstrom mit einem Luftwechsel von mindestens zwölfmal pro Stunde ermöglicht, um einen adequate Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßig verteilte Expositionsatmosphäre zu gewährleisten. Wird eine Kammer verwendet, so ist sie so zu gestalten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden und die Exposition durch Inhalation der Prüfsubstanz maximiert wird. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das „Gesamtvolumen“ der Versuchstiere 5 % des Kammerolumens nicht überschreiten. Möglich ist auch eine Exposition des Mund-Nasen-Bereichs, des Kopfes oder des ganzen Körpers in Inhalationskammern; der Vorteil der beiden ersten Expositionsarten besteht darin, die Aufnahme der Prüfsubstanz auf anderen Wegen einzuschränken.

#### Beobachtungszeitraum

Die Versuchstiere sind während des gesamten Behandlungszeitraumes und der Erholungsphase täglich auf Vergiftungssymptome zu beobachten. Der Eintritt des Todes und der Zeitpunkt, zu dem Vergiftungssymptome auftreten und/oder wieder abklingen, sind festzuhalten.

#### Versuchsdurchführung

Die Tiere werden der Prüfsubstanz täglich an 5 bis 7 Tagen pro Woche über einen Zeitraum von 90 Tagen ausgesetzt. Die Tiere der Satellitengruppe, die für eine Nachbeobachtung vorgesehen sind, sollten für weitere 28 Tage ohne Exposition gehalten werden, um die Reversibilität der toxischen Wirkungen bzw. deren Fortbestehen feststellen zu können. Die Temperatur soll während des Versuchs  $22^{\circ} \pm 3^{\circ}$  C betragen. Die relative Luftfeuchtigkeit soll zwischen 30 und 70 % liegen, was in einigen Fällen (z. B. Versuche mit Aerosolen) jedoch nicht durchführbar sein dürfte. Während der Exposition werden weder Futter noch Wasser verabreicht.

Es soll ein dynamisches Inhalationssystem mit einem geeigneten analytischen Verfahren zur Bestimmung der Konzentration benutzt werden. Um brauchbare Expositionskonzentrationen zu erhalten, wird ein Vorversuch empfohlen. Die Luftdurchflußrate ist so einzustellen, daß die Bedingungen in der gesamten Expositions-kammer einheitlich sind. Das System soll gewährleisten, daß konstante Expositionsbedingungen so schnell wie möglich erreicht werden.

Folgende Messungen oder Überwachungen sind durchzuführen:

- a) Luftdurchflußrate (kontinuierlich);
- b) die tatsächliche Konzentration der Prüfsubstanz wird im Atembereich gemessen. Während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  vom Mittelwert variieren. Bei Stäuben und einigen Aerosolen, wo dieser Wert nicht erreichbar ist, wird ein größerer Streubereich akzeptiert. Während der gesamten Versuchsdauer ist die Konzentration von Tag zu Tag so konstant wie möglich zu halten. Während des Versuchsaufbaus sollte eine Teilchengrößenanalyse durchgeführt werden, um die Konstanz der Aerosolkonzentrationen zu bestimmen. Während der Expositionszeit ist die Analyse so oft wie möglich zu wiederholen, um die Konstanz der Teilchengrößenverteilung zu kontrollieren.
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
- d) während und nach der Exposition werden die Tiere beobachtet und die Befunde aufgezeichnet und im Bericht für jedes Tier festgehalten. Alle Tiere sollen täglich auf Anzeichen toxischer Effekte beobachtet und deren Auftreten, Grad und Dauer aufgezeichnet werden. Die Beobachtungen der Tiere sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des zentralen Nervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Menge des aufgenommenen Futters und das Gewicht der Tiere werden wöchentlich bestimmt. Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist erforderlich, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren

während des Versuchs nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Nach Abschluß der Expositionsphase werden alle überlebenden Tiere, mit Ausnahme der Tiere der Satellitengruppe, seziiert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziiert werden.

Bei allen Tieren, einschließlich der Kontrolltiere, sind üblicherweise folgende Untersuchungen durchzuführen:

- a) eine ophthalmologische Untersuchung mit Hilfe eines Ophthalmoskops oder eines gleichwertigen geeigneten Geräts sollte vor der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz und zum Abschluß der Studie — vorzugsweise bei allen Tieren, zumindest jedoch in der Gruppe mit der höchsten Dosierung und in der Kontrollgruppe — durchgeführt werden. Sind bei Versuchsende Veränderungen an den Augen feststellbar, sind alle Tiere zu untersuchen.
- b) Am Ende des Versuches sind hämatologische Untersuchungen einschließlich Hämatokritwert und Hämoglobinkonzentration, Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Differenzialblutbild, Messungen der Gerinnungsfähigkeit, z. B. Gerinnungszeit, Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit oder Thrombozytenzahl, durchzuführen.
- c) Am Ende des Versuches sind ebenfalls klinisch-chemische Analysen des Blutes durchzuführen. Für diese Untersuchungen eignen sich folgende Analysen: Elektrolytbilanz, Kohlenhydratstoffwechsel, Leber- und Nierenfunktion. Die Durchführung spezifischer Analysen richtet sich nach der festgestellten Wirkungsweise der Prüfsubstanz. Vorgeschlagen werden folgende Bestimmungen: Kalzium, Phosphor, Chlorid, Natrium, Kalium, Nüchternblutglukose (mit auf die Tierart abgestimmter Fastenperiode), Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (1), Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (2), Ornithin-Decarboxylase, Gamma-Glutamyl-transpeptidase, Harnstickstoff, Albumin, Kreatinin, Gesamtbilirubin- und -Serumeiweißmessungen. Weitere Analysen, die gegebenenfalls für eine geeignete toxikologische Bewertung erforderlich sind, umfassen: Lipide, Hormone, Säuren/Basen-Gleichgewicht, Methämoglobin, Cholinesteraseaktivität. Zusätzliche klinisch-chemische Analysen können erforderlich sein, um die Untersuchung der beobachteten Wirkungen zu vertiefen.
- d) In der Regel ist eine Urinanalyse nicht notwendig, erscheint jedoch erforderlich, sofern eine toxische Wirkung zu erwarten oder zu beobachten ist.

Erweisen sich Daten aus vorangegangenen Versuchen als ungeeignet, sollte eine Bestimmung hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter vor Versuchsbeginn in Betracht gezogen werden.

#### Autopsie

Bei allen im Versuch befindlichen Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen, einschließlich einer Untersuchung der Körperoberfläche, aller Körperöffnungen sowie der Schädel, Brust- und Bauchhöhle einschließlich der jeweiligen Organe. Leber, Nieren, Nebennieren und Hoden werden sobald wie möglich nach der Sektion feucht gewogen, um ein Austrocknen zu verhindern. Die folgenden Organe und Gewebe sind für eine eventuelle spätere histopathologische Untersuchung in einem geeigneten Medium aufzubewahren: alle Organe mit makroskopischen Veränderungen, Lungen, die vollständig und unversehrt entnommen, gewogen und mit einem geeigneten Fixiermittel konserviert werden, um die Lungenstruktur zu erhalten (als geeignetes Verfahren gilt die Perfusion der Lunge mit einer Fixierflüssigkeit), Gewebe von Nase und Pharynx, Gehirn, einschließlich Medulla/Pons, der Kleinhirn- und Großhirnrinde, der Hypophyse, der Schilddrüse/Nebenschilddrüse, des Thymusgewebes, von Trachea, Herz, Aorta, Speicheldrüse, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus (akzessorische Geschlechtsorgane), (Haut), Gallenblase (sofern vorhanden), Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Coecum, Kolon, Rektum, Harnblase, repräsentative Lymphknoten (weiblich Brustdrüse), (Oberschenkelmuskulatur), Nerven des peripheren Systems (Augen), Brustbein mit Knochenmark (Femur, einschließlich Gelenkoberfläche), (Wirbelsäule in drei Ebenen: Hals-, mittlerer Thorax- und Lendenbereich) sowie (extraorbitale Tränendrüse). Die in Klammern angegebenen Gewebe sind nur bei Anzeichen von Toxizität oder bei Einbeziehung des Zielorgans zu untersuchen.

#### Histopathologische Untersuchung

- a) Bei allen Tieren der Kontrollgruppe und den Tieren mit der höchsten Dosis ist eine vollständige histopathologische Untersuchung des Respirationstraktes sowie sonstiger Organe und Gewebe durchzuführen;
- b) alle Organe mit makroskopischen Veränderungen sind zu untersuchen;
- c) die Zielorgane der Tiere der anderen Dosisgruppen sind zu untersuchen;
- d) die Lungen der Tiere in der Gruppe mit niedriger und mittlerer Konzentration sind histopathologisch zu untersuchen, daß eine geeignete Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere möglich ist. Weitere histopathologische Untersuchungen der Tiere dieser Gruppen sind routinemäßig nicht erforderlich, müssen jedoch bei den Tieren der Gruppe mit der höchsten Konzentration stets für alle geschädigten Organe durchgeführt werden;
- e) bei den Tieren der Satellitengruppe sind jene Organe und Gewebe histopathologisch zu untersuchen, die in den behandelten Gruppen auf die Prüfsubstanz reagierten.

(1) Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

(2) Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderung sowie der Prozentsatz der Tiere für jede Art der Veränderung, hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen:

*Beschreibung des Expositionsapparates:* einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in einer Versuchskammer. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und ggf. Konstanz der Aerosolkonzentration oder Teilchengröße sind zu beschreiben.

*Expositionsdaten:* Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankung (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
- b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
- c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
- d) ggf. Art des Vehikels;
- e) tatsächliche Konzentrationen im Atembereich;
- f) mittlere Teilchengrößen (sofern erforderlich).

- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Konzentration;
- nichttoxische Konzentration, sofern möglich;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- ophthalmologische Befunde;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnisse einer evtl. Urinanalyse);
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

### 3.2. Interpretation

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## 4. LITERATUR

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## B. 30

### PRÜFUNG AUF CHRONISCHE TOXIZITÄT

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugsubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird normalerweise für einen größeren Teil der Lebensdauer den Versuchstiergruppen an 7 Tagen pro Woche auf einem geeigneten Verabreichungsweg appliziert, und zwar jeweils eine Dosierung je Gruppe. Während und nach der Exposition werden die Versuchstiere täglich auf Vergiftungserscheinungen beobachtet.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitung*

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Anzahl von Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

###### *Versuchsbedingungen*

###### *Versuchstiere*

Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Auf der Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Studien können jedoch andere Tierarten (Nager oder Nichtnager) verwendet werden. Die Tests sind mit jungen gesunden Tieren gebräuchlicher Versuchstierstämme durchzuführen; mit der Verabreichung der Prüfsubstanz sollte in einem geeigneten Zeitraum nach der Entwöhnung vom Muttertier begonnen werden.

Bei Versuchsbeginn sollte die Variabilität des Körpergewichtes der Tiere nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische orale Toxizitätsstudie einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

###### *Anzahl und Geschlecht*

Bei Nagern sollten mindestens 40 Tiere (20 weibliche und 20 männliche) für jede Dosierung und die entsprechende Kontrollgruppe verwendet werden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen.

Bei Nichtnagern ist eine geringerer Anzahl an Tieren, mindestens jedoch 4 pro Geschlecht und Dosisgruppe zulässig.

###### *Dosierungen und Expositionshäufigkeit*

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe zu verwenden. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß auf jeden Fall toxische Wirkungen auftreten, jedoch keine übermäßig hohe Todesrate eintritt. Die niedrigste Dosierung darf keine Anzeichen von Toxizität hervorrufen. Die mittlere Dosierung liegt zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung.

Bei der Auswahl der Dosierungen sind Daten aus vorangegangenen Versuchen zu berücksichtigen.

Normalerweise erfolgt die Exposition täglich. Wird die Substanz im Trinkwasser verabreicht oder mit dem Futter vermischt, müssen Wasser bzw. Futter den Tieren jederzeit zugänglich sein.

#### Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppe muß, abgesehen von der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz, in jeder Hinsicht den Versuchstiergruppen entsprechen.

Unter besonderen Bedingungen, wie z. B. bei Verwendung eines Aerosols bei Inhalationsstudien oder eines Emulgators mit unbekannter biologischer Wirkung bei oralen Toxizitätsstudien, empfiehlt sich der Einsatz einer zusätzlichen unbehandelten Kontrollgruppe. Diese Gruppe wird in gleicher Weise behandelt wie alle übrigen Versuchstiere, darf jedoch weder der Prüfsubstanz noch irgendeines Vehikels gegenüber exponiert werden.

#### Verabreichungsweg

Es finden in der Hauptsache die orale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungsweges hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der voraussichtlichen Art der Exposition beim Menschen ab.

Der dermale Verabreichungsweg wirft erhebliche praktische Probleme auf. Eine chronische systematische Toxizität als Folge einer perkutanen Absorption läßt sich normalerweise aus den Ergebnissen der oralen Toxizitätsstudie und der Kenntnis über den aus vorangegangenen perkutanen Toxizitätsbestimmungen ermittelten Umfang der perkutanen Absorption ableiten.

#### Orale Applikation

Wird die Prüfsubstanz vom Magen-Darm-Trakt absorbiert und ist eine Exposition beim Menschen auf oralem Wege möglich, sollte, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, der orale Verabreichungsweg gewählt werden. Den Tieren sollte die Prüfsubstanz im Futter, gelöst im Trinkwasser oder in Kapseln zugeführt werden.

Wünschenswert ist eine tägliche Verabreichung an sieben Tagen pro Woche, da bei einem fünftägigen Rhythmus die verabreichungsfreie Zeit eine Erholung bzw. einen Rückgang von Vergiftungserscheinungen ermöglicht und so das Ergebnis und die Bewertung beeinflussen kann. Aus praktischen Überlegungen ist jedoch ein fünftägiger Verabreichungsrhythmus als annehmbar zu betrachten.

#### Inhalative Applikation

Da Studien über die inhalative Applikation im Vergleich zu den sonstigen Verabreichungswegen größere technische Probleme aufwerfen, soll hier eine ausführlichere Anleitung gegeben werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die intratracheale Instillation in besonderen Fällen durchaus eine gültige Alternative darstellt.

Bei langfristigen Expositionen legt man üblicherweise entweder eine angenommene Exposition beim Menschen zugrunde, wobei die Tiere bei einheitlicher Testkammerkonzentration 5 Tage lang täglich 6 Stunden exponiert werden (intermittierende Exposition). Oder man geht von einer möglichen Umweltexposition aus, bei der die Tiere an 7 Tagen jeweils 22 bis 24 Stunden der Prüfsubstanz ausgesetzt sind (kontinuierliche Exposition) und wobei pro Tag jeweils zur gleichen Zeit eine Stunde zur Fütterung und Wartung der Kammer vorgesehen ist.

In beiden Fällen werden die Tiere normalerweise einer festgesetzten Konzentration der Prüfsubstanz ausgesetzt. Der Hauptunterschied, der zwischen der intermittierenden und der kontinuierlichen Exposition zu berücksichtigen ist, liegt darin, daß sich die Tiere im ersteren Falle während einer 17 bis 18stündigen expositionsfreien Periode und während des noch längeren Zeitraums am Wochenende möglicherweise von den Auswirkungen der täglichen Exposition erholen.

Welche der beiden Expositionsformen gewählt wird, hängt von den Zielsetzungen der jeweiligen Studie sowie von den beim Menschen gegebenen Voraussetzungen ab, die mit dem Test simuliert werden sollen. Einige technische Schwierigkeiten müssen jedoch berücksichtigt werden. So dürfte z. B. der Vorteil der kontinuierlichen Exposition bei der Simulierung von Umgebungsbedingungen sowohl durch die Notwendigkeit aufgehoben werden, die Tiere mit Wasser und Futter zu versorgen als auch durch den Bedarf an besser entwickelten (und zuverlässigeren) Aerosol sowie Dampferzeugungs- und Überwachungstechniken zu warten.

#### Expositionskammern

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die eine dynamische Luftgeschwindigkeit mit einer Luftwechselrate von mindestens 12 mal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz in der Atmosphäre zu gewährleisten. Die Testkammern für die Kontroll- wie für die Versuchstiere sollten in Konzeption und Ausführung identisch sein, um in jeder Hinsicht — mit Ausnahme der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz — vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen. Üblicherweise wird in der Testkammer ein geringer Unterdruck erzeugt, um ein Entweichen der Prüfsubstanz aus der Kammer zu vermeiden. Die Testkammern sollten gewährleisten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte das Gesamtvolumen der Versuchstiere grundsätzlich 5% des Kammervolumens nicht überschreiten.

Folgende Messungen oder Kontrollen sind durchzuführen:

- a) Luftströmung: die Luftdurchflußrate innerhalb der Testkammer sollte vorzugsweise kontinuierlich überwacht werden;
- b) Während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  des Mittelwerts variieren.
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit: Bei Nagern soll die Temperatur  $22^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) betragen und die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Kammer zwischen 30 und 70 % liegen, es sei denn, die Prüfsubstanz wird mit Hilfe von Wasser in der Testkammer suspendiert. Es empfiehlt sich, beide Größen kontinuierlich zu überwachen.
- d) Teilchengrößenmessungen: Sowohl für Flüssig- als auch für Feststoffaerosole ist eine Bestimmung der Teilchengrößenverteilung in der Kammeratmosphäre vorzunehmen. Die Aerosolteilchen müssen für die Versuchstiere lungengängig sein. Stichproben sind in der Atemzone der Tiere zu entnehmen. Sie müssen repräsentativ für die Teilchenverteilung sein, der die Tiere ausgesetzt sind und sollten außerdem alle suspendierten Aerosole, auch wenn sie zum Großteil nicht lungengängig sind, gravimetrisch erfassen. Beim Aufbau der Versuchsanlage muß die Teilchengröße-Analyse so oft wie nötig wiederholt werden, um die Stabilität der Aerosolkonzentration zu gewährleisten. Während der folgenden Expositionen ist eine Wiederholung nur so oft erforderlich, wie es für eine angemessene Bestimmung der Konsistenz der Teilchenverteilung, der die Tiere ausgesetzt waren, notwendig ist.

#### Versuchsdauer

Der Verabreichungszeitraum sollte mindestens 12 Monate betragen.

#### Verfahren

##### Beobachtungen

Mindestens einmal am Tag ist eine sorgfältige klinische Untersuchung vorzunehmen. Eine zusätzliche tägliche Beobachtung der Tiere ist außerdem erforderlich, um sicherzustellen, daß der Tierversuch so gering wie möglich bleibt, z. B. durch Autopsie oder Kühlung der tot aufgefundenen Tiere sowie durch Isolierung oder Tötung schwacher bzw. kranker Tiere. Eine sorgfältige Beobachtung ist angezeigt, um den Beginn und die Weiterentwicklung von Vergiftungserscheinungen festzustellen und um Verluste des Tierbestandes aufgrund von Krankheiten, Autolyse oder Kannibalismus weitestgehend einschränken zu können.

Klinische Symptome, einschließlich neurologischer und Augenveränderungen sowie Mortalität sind für alle Tiere aufzuzeichnen. Der Zeitpunkt des Auftretens und der Weiterentwicklung des toxischen Zustandes, einschließlich der Bildung verdächtiger Tumoren, ist ebenfalls festzuhalten.

Das Körpergewicht jedes Einzeltieres ist während der ersten dreizehn Wochen des Tests einmal wöchentlich und anschließend mindestens einmal alle vier Wochen festzustellen. Die Nahrungsaufnahme wird während der ersten 13 Wochen der Studie und anschließend in etwa dreimonatigen Abständen bestimmt, sofern nicht der Gesundheitszustand oder das Körpergewicht der Tiere andere Maßnahmen erforderlich machen.

##### Hämatologische Untersuchung

Eine hämatologische Untersuchung (z. B. Hämoglobingehalt, Hämatokritwert, Gesamtzahl der roten Blutkörperchen, Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen, Blutplättchen oder sonstige Messungen der Gerinnungsfähigkeit) anhand der Blutproben von allen Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen sollte nach 3 Monaten, nach 6 Monaten und anschließend in etwa sechsmonatigen Abständen sowie nach Abschluß der Studie durchgeführt werden. Sofern durchführbar, sollten diese Blutproben bei jeder Untersuchung von den gleichen Ratten stammen. Zusätzlich ist Nichtnagern vor Beginn des Versuchs eine Blutprobe zu entnehmen.

Läßt die klinische Beobachtung auf eine Verschlechterung des Gesundheitszustands der Tiere im Verlauf der Studie schließen, kann ein Differentialblutbild der erkrankten Tiere erstellt werden.

Das Differentialblutbild wird aus den Blutproben von Tieren der höchsten Dosisgruppe und von Tieren der Kontrollgruppe erstellt. Für die Tiere der niedrigeren Dosisgruppe(n) ist die Erstellung eines Differentialblutbildes nur erforderlich, wenn zwischen der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe erhebliche Abweichungen bestehen oder wenn die pathologische Untersuchung dies nahelegt.

##### Urinanalyse

Urinproben sind von den Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht von allen Dosisgruppen möglichst in den gleichen zeitlichen Abständen wie bei der vorstehend beschriebenen hämatologischen Untersuchung zu entnehmen. Bei Nagern sollten die folgenden Analysen entweder von jedem Einzeltier oder auf der Grundlage einer Sammelprobe Geschlecht/Gruppe durchgeführt werden:

- Aussehen: Volumen und spezifisches Gewicht für jedes Einzeltier;



- Protein, Glukose, Ketone, Blut (semiquantitativ);
- Urinsediment (semiquantitativ).

#### Klinische Chemie

In etwa halbjährlichen Abständen und bei Abschluß der Untersuchung werden von allen Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen — wenn möglich jeweils von den gleichen Ratten — Blutproben zu klinisch-chemischen Messungen entnommen.

Zusätzlich sollte vor dem Versuch von allen Nichtnagern eine Blutprobe entnommen werden. Mit dem aus diesen Proben gewonnenen Plasma werden folgende Analysen durchgeführt:

- Gesamtproteinkonzentration;
- Albuminkonzentration;
- Leberfunktionstests (wie alkalische Phosphatase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup> und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase <sup>(2)</sup>), Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, Ornithin-Dekarboxylase;
- Kohlenhydratstoffwechsel, z. B. Nüchternglukose;
- Nierenfunktionstest, z. B. Harnstickstoff im Blut.

#### Autopsie

An allen Tieren, einschließlich der während des Versuchs gestorbenen bzw. aus Krankheitsgründen getöteten Tiere, wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Zuvor sollten von allen Tieren Blutproben zur Erstellung eines Differentialblutbildes entnommen werden. Alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Tumoren oder tumorverdächtige Veränderungen müssen fixiert werden. Man sollte versuchen, die Beobachtungen der Autopsiebefunde mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung zu korrelieren.

Alle Organe und Gewebe sind für die mikroskopische Untersuchung zu fixieren. Hierzu zählen gewöhnlich folgende Organe und Gewebe: Gehirn <sup>(3)</sup> (Medulla/Pons, Kleinhirn- und Großhirnrinde), Hypophyse, Schilddrüse (einschließlich Nebenschilddrüse), Thymus, Lungen (einschließlich Trachea), Herz, Aorta, Speicheldrüse, Leber <sup>(3)</sup>, Milz, Nieren <sup>(3)</sup>, Nebennieren <sup>(3)</sup>, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon, Rektum, Uterus, Harnblase, Lymphknoten, Pankreas, Gonaden <sup>(3)</sup>, akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüse, Haut, Muskulatur, Nerven des peripheren Systems, Wirbelsäule (Hals-, Thorax-, Lendenbereich), Brustbein mit Knochenmark und Femur (einschließlich Gelenk) und Augen. Die Instillierung der Lungen und der Harnblase mit Fixierlösung stellt die optimale Konservierung dieser Gewebe dar; bei Inhalationsstudien ist eine derartige Aufblähung der Lungen Voraussetzung zur Durchführung einer geeigneten histopathologischen Untersuchung. Bei Spezialuntersuchungen wie Inhalationsstudien muß der gesamte Respirationstrakt, einschließlich Nase, Pharynx und Larynx untersucht werden.

Werden sonstige klinische Untersuchungen durchgeführt, sollten die daraus gewonnenen Ergebnisse vor der mikroskopischen Untersuchung vorliegen, da sie dem Pathologen wichtige Hinweise geben können.

#### Histopathologie

Alle sichtbaren Veränderungen, insbesondere Tumoren oder sonstige Veränderungen an Organen, sind mikroskopisch zu untersuchen. Zusätzlich werden folgende Verfahren empfohlen:

- a) Mikroskopische Untersuchung aller fixierten Organe und Gewebe mit vollständiger Beschreibung aller nachgewiesenen Veränderungen bei:
  1. allen Tieren, die im Verlauf der Studie starben oder getötet wurden und
  2. alle Tiere aus der höchsten Dosisgruppe und aus den Kontrollgruppen;
- b) in den niedrigeren Dosisgruppen sind auch die Organe und Gewebe zu untersuchen, welche Veränderungen aufweisen, die eindeutig oder möglicherweise auf die Prüfsubstanz zurückzuführen sind;
- c) wenn die Ergebnisse des Versuchs zeigen, daß die normale Lebensdauer des Tieres wesentlich beeinflusst wird oder daß es zu Folgeerscheinungen kommt, die die toxische Reaktion beeinflussen, muß die nächstniedrigere Dosisgruppe in der zuvor beschriebenen Weise untersucht werden;
- d) Information über die Häufigkeit wie Spontanveränderungen, die normalerweise innerhalb des Bestands der benutzten Tiere (unter identischen Laborbedingungen, d. h. unter Berücksichtigung historischer Kontrollen) auftreten, ist für eine korrekte Bewertung der Signifikanz der bei den exponierten Tieren beobachteten Veränderungen unerlässlich.

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(3)</sup> Diese Organe, entnommen von zehn Tieren pro Geschlecht/Gruppe der Nager und von allen Nichtnagern, einschließlich der Schilddrüse (mit Nebenschilddrüse) von allen Nichtnagern, sind außerdem zu wiegen.

2. **DATEN**

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus muß für jede Versuchsgruppe die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit Veränderungen, die Art der Veränderungen sowie der Prozentsatz der Tiere pro Veränderung hervorgehen. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen:
  - Beschreibung des Expositionsapparates:  
einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in der Versuchskammer während der Durchführung der Versuche. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und gegebenenfalls Stabilität der Aerosolkonzentration oder der Teilchengröße sind zu beschreiben.
  - Expositionsdaten:  
Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankung (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:
    - a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
    - b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
    - c) nominale Konzentration (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
    - d) gegebenenfalls Art des Vehikels;
    - e) tatsächliche Konzentration im Atembereich;
    - f) mittlere Teilchengröße (sofern erforderlich);
- Dosierungen (gegebenenfalls Vehikel, sofern benutzt) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- nichttoxische Dosis;
- Zeitpunkt des Todes während des Versuches bzw. Angabe, ob die Tiere bis zum Abschluß des Versuches überlebten;
- Beschreibung toxischer und anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futtermittelverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- ophthalmologische Befunde;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich Ergebnisse einer evtl. Urinanalyse);
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**B. 31**  
**PRÜFUNG AUF TERATOGENITÄT**

**1. METHODE**

**1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen trächtiger Versuchstiere in abgestuften Dosierungen bzw. Konzentrationen in jeweils einer Dosierung je Gruppe verabreicht, und zwar mindestens während der gesamten Phase der Organogenese. Kurz vor dem erwarteten Geburtstermin wird das Muttertier getötet, der Uterus entnommen und der Inhalt untersucht. Dieses Prüfverfahren gilt für die embryonale und die fetale Toxizität.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode**

*Vorbereitung*

Gesunde, junge, ausgewachsene, virginelle weibliche Tiere vergleichbaren Alters und vergleichbarer Größe werden mindestens 5 Tage vor Testbeginn an die Laborbedingungen akklimatisiert und dann mit männlichen Tieren mit nachgewiesener Fruchtbarkeit gepaart. Die besamten Weibchen werden randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Paarung kann auf natürlichem Wege oder durch künstliche Befruchtung erfolgen.

Die Prüfsubstanz wird den weiblichen Tieren bald nach der Implantation und während der gesamten Phase der Organogenese täglich verabreicht. Einen Tag vor dem Geburtstermin werden die Feten durch Hysterektomie gewonnen und auf Organ- und Skelettenomalien einschließlich Wachstumshemmungen, verzögerte Knochenbildung und Hämorrhagien untersucht.

*Versuchsbedingungen*

*Versuchstiere*

Üblicherweise werden Ratte, Maus, Hamster und Kaninchen eingesetzt. Bevorzugte Tierarten sind Ratte und Kaninchen. Die Tests sind mit gebräuchlichen Versuchstierstämmen durchzuführen. Die verwendeten Tierstämme sollten eine ausreichende Fruchtbarkeit besitzen und ihre Empfindlichkeit gegen Teratogene bekannt sein. Die Tiere sind in Einzelkäfigen zu halten.

*Anzahl und Geschlecht*

Für jede Dosisgruppe sind mindestens 20 trächtige Ratten, Mäuse oder Hamster oder 12 trächtige Kaninchen erforderlich. Es muß gewährleistet sein, daß genügend Würfe und Jungtiere erzeugt werden, um eine Bewertung des teratogenen Potentials der Prüfsubstanz zu ermöglichen.

*Dosierungen*

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe zu verwenden. Wird die Prüfsubstanz über ein Vehikel verabreicht, so ist eine entsprechende Vehikel-Kontrollgruppe einzusetzen. Die toxischen Eigenschaften des Vehikels müssen bekannt sein; es sollte weder teratogen sein noch Auswirkungen auf die Reproduktion haben. Die Kontrollgruppe(n) ist (sind), abgesehen von der Applikation der Prüfsubstanz, in gleicher Weise zu behandeln

wie die Versuchsgruppen. Sofern die physikalisch-chemischen oder biologischen Eigenschaften der Prüfsubstanz es zulassen, sollte die höchste Dosisgruppe möglichst so gewählt werden, daß zwar geringe Vergiftungserscheinungen beim Muttertier auftreten, wie z. B. geringfügiger Gewichtsverlust, die Anzahl der Todesfälle 10 % jedoch nicht überschreitet. Die niedrigste Dosierung sollte keine erkennbaren, prüfsubstanzbedingten Wirkungen erzeugen. Die mittlere(n) Dosierung(en) sollte(n) das geometrische Mittel zwischen der höchsten und der schwächsten Dosierung bilden.

#### Limit-Test

Wenn sich im Falle einer Prüfsubstanz mit geringer Toxizität bei einer Dosierung von mindestens 1 000 mg/pro kg Körpergewicht keine embryonale Toxizität oder Teratogenität nachweisen läßt, sind Untersuchungen mit anderen Dosierungen nicht notwendig.

#### Expositionszeit

Als Tag 0 des Versuchs gilt der Tag, an dem ein Vaginalpropf und/oder Sperma festgestellt wurde (sofern durchführbar). Die Behandlung soll während der Organogenese erfolgen. Dies sind bei der Ratte und der Maus Tag 6 bis 15 p.c., beim Hamster Tag 6 bis 14 p.c. und beim Kaninchen Tag 6 bis 18 p.c. Basiert die Festsetzung des Tages 0 auf der Beobachtung der Paarung bzw. der künstlichen Befruchtung, sind die oben genannten Daten durch Hinzufügung eines weiteren Tages zu korrigieren. Alternativ kann der Behandlungszeitraum bis etwa einen Tag vor dem erwarteten Geburtstermin ausgedehnt werden.

#### Beobachtungszeitraum

Mindestens einmal täglich sollte eine sorgfältige klinische Untersuchung durchgeführt werden. Eine tägliche Beobachtung der Tiere ist außerdem erforderlich, um sicherzustellen, daß der Tierverlust während der Studie so gering wie möglich bleibt.

#### Verfahren

Die Prüfsubstanz wird oral mit der Magensonde, und zwar täglich etwa zur gleichen Zeit verabreicht.

Den weiblichen Versuchstieren wird die Prüfsubstanz während des Behandlungszeitraums täglich appliziert.

Bei der Bestimmung der Dosismenge legt man entweder das Ausgangsgewicht der weiblichen Tiere zugrunde oder — im Hinblick auf die schnelle Gewichtszunahme während der Gravidität — man bestimmt in periodischen Abständen das Körpergewicht der Tiere und legt die Dosismenge entsprechend fest. Vergiftungserscheinungen sowie deren Beginn, Grad und Dauer sind unmittelbar nach der Feststellung aufzuzeichnen. Muttertiere mit Anzeichen einer Fehlgeburt oder Frühgeburt müssen getötet und sorgfältig makroskopisch untersucht werden. Nach der Behandlung müssen die Tiere bis etwa einen Tag vor der Geburt beobachtet werden. Dies soll gewährleisten, daß zwar der Großteil der Trächtigkeit überwacht, die Bewertung der Ergebnisse jedoch nicht durch das Eintreten einer natürlichen Geburt beeinträchtigt werden. Die Beobachtungen sollten sich insbesondere auf Veränderungen an Haut, Fell, Augen und Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des zentralen Nervensystems sowie auf Samotomotorik und Verhaltensmuster erstrecken. Die Menge des aufgenommenen Futters sollte wöchentlich bestimmt werden und das Gewicht der Tiere wird wöchentlich bestimmt.

#### Autopsie

Jedes Muttertier, das während oder nach Abschluß der Studie stirbt, sollte makroskopisch auf Anomalien oder pathologische Veränderungen untersucht werden, die möglicherweise Einfluß auf die Trächtigkeit hatten. Unmittelbar nach dem Tod ist der Uterus zu entnehmen und auf tote Embryonen oder Feten bzw. auf die Anzahl der lebenden Feten zu untersuchen. Normalerweise ist es möglich, den Zeitpunkt des intrauterinen Fruchttodes abzuschätzen. Bei Ratten und Kaninchen kann die Anzahl der *corpora lutea* bestimmt werden.

Das Geschlecht der Feten muß bestimmt, das individuelle Körpergewicht ermittelt und aufgezeichnet und das mittlere Fetalgewicht daraus berechnet werden. Außerdem muß jeder Fetus nach der Entnahme aus dem Uterus äußerlich untersucht werden. Bei Ratten, Mäusen und Hamstern wird ein Drittel, maximal die Hälfte jedes Wurfs präpariert und auf Skelettanomalien untersucht, der andere Teil des Wurfs wird mit Hilfe geeigneter Untersuchungsmethoden auf Anomalien der Weichteile analysiert. Bei Kaninchen wird jeder Fetus anhand einer sorgfältigen Autopsie auf viszerale und anschließend auf Skelettfehlbildungen untersucht.

2.

#### DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, Anzahl der Tiere, die trächtig wurden, Anzahl und Prozentsatz der Lebendgeburten und der Feten mit Weichteil- oder Skelett-Fehlbildungen in Relation zum jeweiligen Wurf. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Versuchsbedingungen;
- Dosierungen (ggf. Vehikel, sofern verwendet) und Konzentrationen;
- Daten über toxische Reaktionen nach Dosierung;
- nichttoxische Dosierung (sofern möglich);
- Zeitpunkt des Todes während des Versuchs bzw. Angabe, ob die Tiere den Versuch überlebten;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der einzelnen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- Dauer der Trächtigkeit, Angaben über den Wurf (einschließlich historischer Daten);
- Daten über die Feten (Lebend- und/oder Totgeburten, Geschlecht, Weichteil- und Skelettfehlbildungen);
- Daten über den Wurf (Lebend- und/oder Totgeburten, Geschlecht, Weichteil- und Skelettfehlbildungen für jeden Wurf);
- statistische Auswertung der Ergebnisse;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**B. 32**  
**PRÜFUNG AUF KANZEROGENITÄT**

**1. METHODE**

**1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird normalerweise für einen größeren Teil der Lebensdauer den Versuchstiergruppen an 7 Tagen pro Woche auf einem geeigneten Verabreichungsweg appliziert, und zwar jeweils eine Dosierung je Gruppe. Während und nach der Exposition werden die Versuchstiere täglich auf Vergiftungserscheinungen, insbesondere auf die Entwicklung von Tumoren, beobachtet.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode**

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen unter experimentellen Haltungs- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Anzahl von Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

**Versuchstiere**

Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Auf der Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Studien können jedoch auch andere Tierarten (Nager oder Nichtnager) verwendet werden. Die Tests sind mit jungen gesunden Tieren gebräuchlicher Versuchstierstämme durchzuführen; mit der Verabreichung der Prüfsubstanz sollte in einem geeigneten Zeitraum nach der Entwöhnung vom Muttertier begonnen werden.

Bei Versuchsbeginn sollte die Variabilität des Körpergewichtes der Tiere nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische orale Toxizitätsbestimmung einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollten in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

**Anzahl und Geschlecht**

Bei Nagern sind mindestens 100 Tiere (50 weibliche und 50 männliche) für jede Dosierung und die entsprechende Kontrollgruppe zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen.

**Dosierungen und Expositionshäufigkeit**

Es sind mindestens drei Dosisgruppen und eine zusätzliche Kontrollgruppe zu verwenden. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß nur geringgradige Vergiftungserscheinungen auftreten, wie etwa eine verzögerte Körpergewichtsentwicklung (weniger als 10%). Die normale Lebensdauer der Tiere sollte jedoch nicht durch andere als durch tumorbedingte Folgeerscheinungen beeinträchtigt werden.

Die niedrigste Dosierung sollte den normalen Verlauf von Wachstum und Entwicklung sowie die Lebensdauer der Tiere nicht beeinträchtigen und keinerlei Anzeichen einer toxischen Wirkung hervorrufen. Sie sollte normalerweise nicht weniger als 10 Prozent der höchsten Dosierung betragen.

Die mittlere Dosierung liegt zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung.

Bei der Auswahl der Dosierungen sind Daten aus vorangegangenen Versuchen zu berücksichtigen.

Die Exposition erfolgt normalerweise täglich. Wird die Substanz im Trinkwasser verabreicht oder mit dem Futter vermischt, müssen Wasser bzw. Futter den Tieren jederzeit zugänglich sein.

#### Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppe muß, abgesehen von der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz, in jeder Hinsicht den Versuchstiergruppen entsprechen.

Unter besonderen Bedingungen, wie z. B. bei Verwendung eines Aerosols bei Inhalationsstudien oder eines Emulgators mit unbekannter biologischer Wirkung bei oralen Toxizitätsstudien empfiehlt sich der Einsatz einer zusätzlichen unbehandelten Kontrollgruppe, der das Vehikel nicht appliziert werden darf.

#### Verabreichungsweg

In der Hauptsache finden die orale, die dermale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungsweges hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der Art der Exposition beim Menschen ab.

##### Orale Applikation

Wird die Prüfsubstanz vom Magen-Darm-Trakt absorbiert und ist eine Exposition beim Menschen auf oralem Weg möglich, sollte, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, der orale Verabreichungsweg gewählt werden. Den Tieren sollte die Prüfsubstanz im Futter, gelöst im Trinkwasser oder in Kapseln zugeführt werden.

Wünschenswert ist eine tägliche Verabreichung an 7 Wochentagen, da bei einem fünftägigen Rhythmus während der verabreichungsfreien Zeit eine Erholung oder ein Rückgang von Vergiftungserscheinungen möglich ist und so das Ergebnis und die Bewertung beeinflussen kann. Aus praktischen Überlegungen ist jedoch ein fünftägiger Verabreichungsrhythmus als annehmbar zu betrachten.

##### Dermale Applikation

Die kutane Exposition durch Auftragen auf die Haut kann gewählt werden, um eine der wichtigen Expositionsarten beim Menschen zu simulieren; sie dient gleichzeitig als Modell für die Induzierung von Hautveränderungen.

##### Inhalative Applikation

Da Studien über die inhalative Applikation im Vergleich zu den sonstigen Verabreichungswegen größere technische Probleme aufwerfen, soll hier eine ausführlichere Anleitung gegeben werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die intratracheale Instillation in besonderen Fällen durchaus eine gültige Alternative darstellt.

Bei langfristigen Expositionen legt man üblicherweise entweder eine angenommene Exposition beim Menschen zugrunde, wonach die Tiere bei einheitlicher Testkammerkonzentration 5 Tage lang täglich 6 Stunden exponiert werden (intermittierende Exposition). Oder man geht von einer möglichen Umweltexposition aus, bei der die Tiere an 7 Tagen jeweils 22 bis 24 Stunden der Prüfsubstanz ausgesetzt sind (kontinuierliche Exposition) und pro Tag jeweils zur gleichen Zeit eine Stunde zur Fütterung und zur Wartung der Kammer vorgesehen ist. In beiden Fällen werden die Tiere normalerweise einer festgesetzten Konzentration der Prüfsubstanz ausgesetzt. Der Hauptunterschied, der zwischen der intermittierenden und der kontinuierlichen Exposition zu berücksichtigen ist, liegt darin, daß sich im ersten Falle die Tiere während einer 17- bis 18stündigen expositionsfreien Periode und während des noch längeren Zeitraums am Wochenende möglicherweise von den Auswirkungen der täglichen Exposition erholen.

Welche der beiden Expositionsformen gewählt wird, hängt von den Zielsetzungen der jeweiligen Studie sowie von den beim Menschen gegebenen Voraussetzungen ab, die mit dem Test simuliert werden sollen. Einige technische Schwierigkeiten müssen jedoch berücksichtigt werden. So dürfte z. B. der Vorteil der kontinuierlichen Exposition bei der Simulierung von Umgebungsbedingungen sowohl durch die Notwendigkeit aufgehoben werden, die Tiere mit Wasser und Futter zu versorgen als auch durch den Bedarf an besser entwickelten (und zuverlässigeren) Aerosol- sowie Dampferzeugungs- und Überwachungstechniken zu warten.

#### Expositionskammern

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die eine dynamische Luftgeschwindigkeit mit einer Luftwechselrate von mindestens zwölfmal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz in der Atmosphäre zu gewährleisten. Die Testkammern für die Kontroll- wie für die Versuchstiere sollten in Konzeption und Ausführung identisch sein, um in jeder Hinsicht — mit Ausnahme der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz — vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen.

Üblicherweise wird in der Testkammer ein geringer Unterdruck erzeugt, um ein Entweichen der Prüfsubstanz aus der Kammer zu vermeiden. Die Testkammern sollten gewährleisten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte grundsätzlich das Gesamtvolumen der Versuchstiere 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten.

Folgende Messungen oder Kontrollen sind durchzuführen:

- a) Luftströmung: die Luftdurchflußrate innerhalb der Testkammer sollte vorzugsweise kontinuierlich überwacht werden.
- b) Während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  des Mittelwertes variieren.  
Während der gesamten Versuchsdauer ist die täglich Konzentration so konstant wie möglich zu halten.
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit: Bei Nagern soll die Temperatur  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) betragen und die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Kammer zwischen 30 und 70 % liegen, es sei denn, die Prüfsubstanz wird mit Hilfe von Wasser in der Testkammer suspendiert. Es empfiehlt sich, beide Größen kontinuierlich zu überwachen.
- d) Teilchengrößenmessungen: Sowohl für Flüssig- als auch für Feststoffaerosole ist eine Bestimmung der Teilchengrößenverteilung in der Kammeratmosphäre vorzunehmen. Die Aerosolteilchen müssen für die Versuchstiere lungengängig sein. Stichproben sind in der Atemzone der Tiere zu entnehmen. Diese Stichproben müssen repräsentativ für die Teilchenverteilung sein, der die Tiere ausgesetzt sind und sollten außerdem alle suspendierten Aerosole, auch wenn sie zum Großteil nicht lungengängig sind, gravimetrisch erfassen. Beim Aufbau der Versuchsanlage muß die Teilchengröße-Analyse so oft wie nötig wiederholt werden, um die Stabilität der Aerosolkonzentration zu gewährleisten. Während der folgenden Expositionen ist eine Wiederholung nur so oft erforderlich, wie es für eine angemessene Bestimmung der Konsistenz der Teilchenverteilung, der die Tiere ausgesetzt wurden, notwendig ist.

#### Versuchsdauer

Die Dauer der Karzinogenitätsstudie umfaßt den größten Teil der Lebensdauer der Versuchstiere. Bei Mäusen und Hamstern sollte die Studie nach 18 Monaten, bei Ratten nach 24 Monaten abgeschlossen werden; bei bestimmten Tierstämmen mit längerer Lebensdauer und/oder geringer spontaner Tumorraten sollte die Studie jedoch erst nach 24 Monaten (Mäuse und Hamster) bzw. 30 Monaten (Ratten) beendet werden. Andererseits ist es vertretbar, eine derart verlängerte Studie dann abzuschließen, wenn die Überlebensrate in der niedrigsten Dosisgruppe oder der Kontrollgruppe 25 % erreicht. Ist ein offensichtlich geschlechtsspezifischer Unterschied in der Reaktion erkennbar, sollten im Hinblick auf den Abschluß der Studie die Versuchstiere in nach Geschlechtern getrennte Gruppen aufgeteilt und gesondert berücksichtigt werden. Ist allein in der hohen Dosisgruppe eine offensichtlich auf die toxische Wirkung zurückzuführende, vorzeitige hohe Sterberate festzustellen, muß dies nicht zwangsläufig den Abschluß der Studie zur Folge haben, vorausgesetzt, die toxische Wirkung wirft in den anderen Dosisgruppen keine schwerwiegenden Probleme auf. Von einem negativen Testergebnis kann nur dann ausgegangen werden, wenn sich der Bestand der Tiere in jeder Gruppe durch Autolyse, Kannibalismus oder durch labortechnische Probleme um nicht mehr als 10 % verringert und bei einer 18monatigen (Mäuse und Hamster) bzw. 24monatigen Studiendauer (Ratten) die Überlebensrate in allen Gruppen nicht unter 50 % liegt.

#### Verfahren

##### Beobachtungen

Bei der täglichen Beobachtung der Tiere sollte insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des Zentralnervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster geachtet werden.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist notwendig, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren während der Studie nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und sezziert werden.

Klinische Symptome und Mortalität sind für jedes Tier aufzuzeichnen. Die Entwicklung von Tumoren ist mit besonderer Aufmerksamkeit zu verfolgen, dabei sind der Zeitpunkt der Entstehung, die Lokalisierung, das Ausmaß, das Erscheinungsbild und die Progression jedes deutlich sichtbaren oder fühlbaren Tumors festzuhalten.

Die Nahrungsaufnahme (und der Wasserverbrauch, sofern die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird) sind während der ersten 13 Wochen der Studie wöchentlich und anschließend in dreimonatigen Abständen zu bestimmen, sofern der Gesundheitszustand oder das Körpergewicht der Tiere nicht andere Maßnahmen erfordern.

Das Körpergewicht jedes Einzeltieres ist während der ersten dreizehn Wochen des Tests einmal wöchentlich und anschließend mindestens einmal alle vier Wochen aufzuzeichnen.



#### *Klinische Untersuchungen*

##### Hämatologie

Läuft die Beobachtung der Tiere auf eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes im Verlauf der Studie schließen, ist ein Differentialblutbild der erkrankten Tiere zu erstellen.

Nach 12 Monaten, 18 Monaten und vor der Tötung wird von allen Tieren ein Blutausschrieb angefertigt. Ein Differentialblutbild wird von Tieren der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe erstellt. Wenn es die Ergebnisse aus dieser, insbesondere jedoch aus der letzten, vor der Tötung vorgenommenen Analyse oder die Daten aus pathologischen Untersuchungen angezeigt erscheinen lassen, ist auch für die nächstniedrigere(n) Gruppe(n) ein Differentialblutbild anzufertigen.

##### Autopsie

An allen Tieren, einschließlich der während des Versuchs gestorbenen bzw. aus Krankheitsgründen getöteten Tieren wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Alle erkennbaren Tumore oder Gewebe mit tumorverdächtigen Veränderungen müssen asserviert werden.

Die folgenden Organe und Gewebe sind in einem geeigneten Medium für eine etwaige spätere histopathologische Untersuchung zu asservieren: alle auffälligen Veränderungen, Gehirn — einschließlich Gewebsschnitte von Medulla/Pons, Kleinhirn- und Großhirnrinde, Hypophyse, Schilddrüse/Nebenschilddrüse, Thymusgewebe, Trachea und Lungen, Herz, Aorta, Speicheldrüsen, Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Pankreas, Gonaden, Uterus, sonstige Geschlechtsorgane, Haut, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon, Rektum, Blase, repräsentative Lymphknoten, weibliche Brustdrüse, Oberschenkelmuskulatur, Nerven des peripheren Systems, Brustbein mit Knochenmark, Femur — einschließlich Gelenkoberfläche, Wirbelsäule, Hals, Thorax- und Lendenbereich, Augen.

Die Instillierung der Lungen und der Harnblase mit Fixierlösung stellt die optimale Konservierung dieser Gewebe dar; bei Inhalationsstudien ist eine derartige Fixierungsmethode der Lungen Voraussetzung für eine optimale histopathologische Untersuchung. Bei Inhalationsstudien muß der gesamte Respirationstrakt, einschließlich Nase, Pharynx und Larynx asserviert werden.

##### Histopathologie

- a) Die Organe aller Tiere, die während des Tests sterben bzw. getötet werden sowie aller Tiere der Kontrollgruppen und der hohen Dosisgruppen werden einer vollständigen histopathologischen Untersuchung unterzogen;
- b) alle Tumoren oder tumorverdächtigen Veränderungen in allen Gruppen;
- c) besteht zwischen der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit neoplastischer Veränderungen, sollte das betreffende Organ bzw. Gewebe auch in den anderen Dosisgruppen einer histopathologischen Untersuchung unterzogen werden;
- d) ist die Überlebensrate in der höchsten Dosisgruppe wesentlich geringer als in der Kontrollgruppe, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen;
- e) lassen sich in der höchsten Dosisgruppe toxische Wirkungen nachweisen, die gegebenenfalls Einfluß auf die Tumorentwicklung haben, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit während des Tests festgestellten Tumoren, der Zeitpunkt der Feststellung und die Anzahl der Tiere, bei denen nach der Autopsie ein Tumor nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu kann eine anerkannte statistische Methode herangezogen werden.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung.

— Versuchsbedingungen:

**Beschreibung des Expositionsapparates**

einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolerzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in der Versuchskammer während der Durchführung der Versuche. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und gegebenenfalls Stabilität der Aerosolkonzentration oder der Teilchengröße sind zu beschreiben.

**Expositionsdaten**

Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankungen (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
  - b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
  - c) nominale Konzentrationen (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
  - d) gegebenenfalls Art des Vehikels;
  - e) tatsächliche Konzentration im Atembereich;
  - f) mittlere Teilchengröße (sofern erforderlich);
- Dosierungen (gegebenenfalls Vehikel, sofern benutzt) und Konzentrationen;
- Daten über die Häufigkeit von Tumoren, gegliedert nach Geschlecht, Dosierung und Art des Tumors;
- Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Tiere bis zum Abschluß des Versuchs überlebten;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse mit Beschreibung des angewandten Verfahrens;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

## B. 33

### KOMBINIERTE STUDIE ZUR PRÜFUNG AUF KANZEROGENITÄT UND CHRONISCHE TOXIZITÄT

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Das Ziel einer kombinierten Toxizitäts-Kanzerogenitätsbestimmung liegt in der Ermittlung der chronischen und kanzerogenen Wirkungen, die eine Substanz nach langdauernder Exposition bei einem Säugetier hervorruft.

Aus diesem Grund wird die Kanzerogenitätsstudie um mindestens eine zusätzliche behandelte Satellitengruppe und eine Kontroll-Satellitengruppe erweitert. Die Dosis der behandelten Satellitengruppe kann höher liegen als die höchste Dosis für den Kanzerogenitätsversuch. Die Versuchstiere der Kanzerogenitätsstudie werden auf allgemeinen Vergiftungserscheinungen und Tumoren untersucht, die Tiere in der behandelten Satellitengruppe auf allgemeine Vergiftungserscheinungen.

Die Prüfsubstanz wird normalerweise für einen größeren Teil der Lebensdauer den Versuchstiergruppen an sieben Tagen pro Woche auf einem geeigneten Verabreichungsweg appliziert, und zwar jeweils eine Dosierung je Gruppe. Während und nach der Exposition werden die Versuchstiere täglich auf Vergiftungserscheinungen, insbesondere auf die Entwicklung von Tumoren, beobachtet.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

Die Tiere werden vor Versuchsbeginn für einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter experimentellen Haltung- und Fütterungsbedingungen eingewöhnt. Vor Versuchsbeginn werden gesunde junge Tiere randomisiert und der erforderlichen Anzahl von Behandlungs- und Kontrollgruppen zugeteilt.

###### Versuchstiere

Bevorzugtes Versuchstier ist die Ratte. Auf der Grundlage der Ergebnisse vorangegangener Studien können jedoch auch andere Tierarten (Nager oder Nichtnager) verwendet werden. Die Tests sind mit jungen gesunden Tieren gebräuchlicher Versuchstierstämme durchzuführen; mit der Verabreichung der Prüfsubstanz sollte in einem geeigneten Zeitraum nach der Entwöhnung vom Muttertier begonnen werden.

Bei Versuchsbeginn sollte die Variabilität des Körpergewichtes der Tiere nicht mehr als  $\pm 20\%$  vom Mittelwert betragen. Wird eine subchronische orale Toxizitätsbestimmung einer Langzeitstudie vorgeschaltet, sollte in beiden Fällen die gleichen Tierarten bzw. Versuchstierstämme benutzt werden.

###### Anzahl und Geschlecht

Bei Nagern sind mindestens 100 Tiere (50 weibliche und 50 männliche) für jede Dosisgruppe und für jede entsprechende Kontrollgruppe zu verwenden. Die Weibchen dürfen weder geworfen haben noch trächtig sein. Sollen im Verlauf des Versuchs Tiere getötet werden, so muß die Gesamtzahl der Tiere um die Zahl an Tieren erhöht werden, die schon vor Versuchsende getötet werden sollen.

Die behandelte(n) Satellitengruppe(n), die der Bewertung pathologischer Anzeichen mit Ausnahme von Tumoren dient (dienen), sollte(n) 20 Tiere je Geschlecht enthalten, während in der Satellitenkontrollgruppe lediglich zehn Tiere pro Geschlecht erforderlich sind.

#### Dosierungen und Häufigkeit der Exposition

Zur Kanzerogenitätsbestimmung sind mindestens drei Dosisgruppen und eine zusätzliche Kontrollgruppe zu verwenden. Die höchste Dosierung ist so zu wählen, daß nur geringgradige Vergiftungserscheinungen auftreten, wie etwa eine verzögerte Körpergewichtsentwicklung (weniger als 10%), ohne jedoch die normale Lebensdauer der Tiere durch andere als durch tumorbedingte Folgeerscheinungen zu beeinträchtigen.

Die niedrigste Dosierung sollte den normalen Verlauf von Wachstum und Entwicklung sowie die Lebensdauer der Tiere nicht beeinträchtigen und keinerlei Anzeichen einer toxischen Wirkung hervorrufen. Sie sollte normalerweise nicht weniger als 10 Prozent der höchsten Dosierung betragen.

Die mittlere Dosierung liegt zwischen der höchsten und der niedrigsten Dosierung.

Bei der Auswahl der Dosierungen sind Daten aus vorangegangenen Versuchen zu berücksichtigen.

Zur Bestimmung der chronischen Toxizität werden zusätzlich behandelte Versuchstiergruppen sowie eine entsprechende Kontroll-Satellitengruppe in die Studie einbezogen. In der behandelten Satellitengruppe sollte die applizierte Dosis so gewählt werden, daß eindeutige Vergiftungserscheinungen auftreten.

Die Exposition erfolgt normalerweise täglich. Wird die Substanz im Trinkwasser verabreicht oder mit dem Futter vermischt, müssen Wasser bzw. Futter den Tieren jederzeit zugänglich sein.

#### Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppe muß, abgesehen von der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz, in jeder Hinsicht der Versuchstiergruppen entsprechen.

Unter besonderen Bedingungen, wie z. B. bei Verwendung eines Aerosols bei Inhalationsstudien oder eines Emulgators mit unbekannter biologischer Wirkung bei oralen Toxizitätsstudien, empfiehlt sich der Einsatz einer zusätzlichen unbehandelten Kontrollgruppe, der das Vehikel nicht appliziert werden darf.

#### Verabreichungsweg

Im wesentlichen finden die orale, die dermale und die inhalative Verabreichung Anwendung. Die Wahl des Verabreichungsweges hängt von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Prüfsubstanz und der Art der Exposition beim Menschen ab.

##### Orale Applikation

Wird die Prüfsubstanz vom Magen-Darm-Trakt absorbiert und ist eine Exposition beim Menschen auf oralem Weg möglich, sollte, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, der orale Verabreichungsweg gewählt werden. Den Tieren sollte die Prüfsubstanz im Futter, gelöst im Trinkwasser oder in Kapseln zugeführt werden.

Wünschenswert ist eine tägliche Verabreichung an sieben Wochentagen, da bei einem fünf-tägigen Rhythmus während der verabreichungsfreien Zeit eine Erholung oder ein Rückgang von Vergiftungserscheinungen möglich ist und so das Ergebnis und die Bewertung beeinflussen kann. Aus praktischen Überlegungen ist jedoch ein fünf-tägiger Verabreichungsrhythmus als annehmbar zu betrachten.

##### Dermale Applikation

Die kutane Exposition durch Auftragen auf die Haut kann gewählt werden, um eine der wichtigsten Expositionsarten beim Menschen zu simulieren; sie dient gleichzeitig als Modell für die Induzierung von Hautveränderungen.

##### Inhalative Applikation

Da Studien über die inhalative Applikation im Vergleich zu den sonstigen Verabreichungswegen weit größere technische Probleme aufwerfen, soll hier eine ausführlichere Anleitung gegeben werden. Es wird darauf hingewiesen, daß die intratracheale Instillation in besonderen Fällen durchaus eine gültige Alternative darstellt.

Bei langfristigen Expositionen legt man üblicherweise entweder eine angenommene Exposition beim Menschen zugrunde, wonach die Tiere bei einheitlicher Testkammerkonzentration fünf Tage lang täglich sechs Stunden exponiert werden (intermittierende Exposition). Oder man geht von einer möglichen Exposition in der Umwelt aus, bei der die Tiere an sieben Tagen jeweils 22 bis 24 Stunden der Prüfsubstanz ausgesetzt sind (kontinuierliche Exposition) und pro Tag jeweils zur gleichen Zeit eine Stunde zur Fütterung und zur Wartung der Kammer vorgesehen ist. In beiden Fällen werden die Tiere normalerweise einer festgesetzten Konzentration der Prüfsubstanz ausgesetzt. Der Hauptunterschied, der zwischen der intermittierenden und der kontinuierlichen Exposition zu berücksichtigen ist, liegt darin, daß sich im ersten Falle die Tiere während der 17 bis 18stündigen expositionsfreien Periode und während des noch längeren Zeitraums am Wochenende möglicherweise von den Auswirkungen der täglichen Exposition erholen.

Welche der beiden Expositionsformen gewählt wird, hängt von den Zielsetzungen der jeweiligen Studie sowie von den beim Menschen gegebenen Voraussetzungen ab, die mit dem Test simuliert werden sollen. Einige technische Schwierigkeiten müssen jedoch berücksichtigt werden. So dürfte z. B. der Vorteil der kontinuierlichen Exposition bei der Simulierung von Umgebungsbedingungen sowohl durch die Notwendigkeit aufgehoben werden, die Tiere mit Wasser und Futter zu versorgen, als auch durch den Bedarf an besser entwickelten (und zuverlässigeren) Aerosol- sowie Dampferzeugungs- und Überwachungstechniken.

#### Expositionskammern

Für die Tierversuche sollte eine Inhalationsanlage benutzt werden, die eine dynamische Luftgeschwindigkeit mit einer Luftwechselrate von mindestens zwölfmal pro Stunde ermöglicht, um einen adäquaten Sauerstoffgehalt und eine gleichmäßige Verteilung der Prüfsubstanz in der Atmosphäre zu gewährleisten. Die Testkammern für die Kontroll- wie für die Versuchstiere sollten in Konzeption und Ausführung identisch sein, um in jeder Hinsicht — mit Ausnahme der Exposition gegenüber der Prüfsubstanz — vergleichbare Voraussetzungen zu schaffen. Üblicherweise wird in der Testkammer ein geringer Unterdruck erzeugt, um ein Entweichen der Prüfsubstanz aus der Kammer zu vermeiden. Die Testkammern sollten gewährleisten, daß die Versuchstiere möglichst wenig zusammengedrängt werden. Um die Stabilität der Atmosphäre in der Inhalationskammer sicherzustellen, sollte das Gesamtvolumen der Versuchstiere grundsätzlich 5 % des Kammervolumens nicht überschreiten.

Folgende Messungen oder Kontrollen sind durchzuführen:

- a) Luftströmung: die Luftdurchflußrate innerhalb der Testkammer sollte vorzugsweise kontinuierlich überwacht werden;
- b) während der täglichen Expositionsdauer darf die Konzentration nicht um mehr als  $\pm 15\%$  des Mittelwertes variieren;  
Während der gesamten Versuchsdauer ist die tägliche Konzentration so konstant wie möglich zu halten;
- c) Temperatur und Luftfeuchtigkeit: Bei Nagern soll die Temperatur  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) betragen und die Luftfeuchtigkeit innerhalb der Kammer zwischen 30 und 70 % liegen, es sei denn, die Prüfsubstanz wird mit Hilfe von Wasser in der Testkammer suspendiert. Es empfiehlt sich, beide Größen kontinuierlich zu überwachen;
- d) Teilchengrößenmessungen: Sowohl für Flüssig- als auch für Feststoffaerosole ist eine Bestimmung der Teilchengrößenverteilung in der Kammeratmosphäre vorzunehmen. Die Aerosolteilchen müssen für die Versuchstiere lungengängig sein. Stichproben sind in der Atemzone der Tiere zu entnehmen. Diese Stichproben müssen repräsentativ für die Teilchenverteilung sein, der die Tiere ausgesetzt sind und sollten außerdem alle suspendierten Aerosole, auch wenn sie zum Großteil nicht lungengängig sind, gravimetrisch erfassen. Beim Aufbau der Versuchsanlage muß die Teilchengrößenanalyse so oft wie nötig wiederholt werden, um die Stabilität der Aerosolkonzentration zu gewährleisten. Während der folgenden Expositionen ist eine Wiederholung nur so oft erforderlich, wie es für eine angemessene Bestimmung der Konsistenz der Teilchenverteilung, der die Tiere ausgesetzt wurden, notwendig ist.

#### Versuchsdauer

Die Dauer der Kanzerogenitätsstudie umfaßt den größten Teil der Lebensdauer der Versuchstiere. Bei Mäusen und Hamstern sollte die Studie nach 18 Monaten, bei Ratten nach 24 Monaten abgeschlossen werden; bei bestimmten Tierstämmen mit längerer Lebensdauer und/oder geringer spontaner Tumorraten sollte die Studie jedoch erst nach 24 Monaten (Mäuse und Hamster) bzw. 30 Monaten (Ratten) beendet werden. Andererseits ist es vertretbar, eine derart verlängerte Studie dann abzuschließen, wenn die Überlebensrate in der niedrigsten Dosisgruppe oder der Kontrollgruppe 25 % erreicht. Ist ein offensichtlich geschlechtsspezifischer Unterschied in der Reaktion erkennbar, sollten die Versuchstiere im Hinblick auf den Abschluß der Studie in nach Geschlechtern getrennte Gruppen aufgeteilt werden. Ist lediglich in der hohen Dosisgruppe vorzeitig eine offensichtlich auf die toxische Wirkung zurückzuführende, hohe Sterberate festzustellen, muß dies nicht zwangsläufig den Abschluß der Studie zur Folge haben, vorausgesetzt, die toxische Wirkung wirft in den anderen Dosisgruppen keine schwerwiegenden Probleme auf. Von einem negativen Testergebnis kann nur dann gesprochen werden, wenn sich der Bestand der Tiere in jeder Gruppe durch Autolyse, Kannibalismus oder durch labortechnische Probleme um nicht mehr als 10 % verringert und die Überlebensrate in allen Gruppen bei einer 18monatigen (Mäuse und Hamster) bzw. 24monatigen Studiendauer (Ratten) nicht unter 50 % liegt.

Die zur Prüfung auf chronische Toxizität eingesetzten 20 exponierten Tiere pro Geschlecht und die dazugehörigen 10 Kontrolltiere pro Geschlecht sollten für mindestens 12 Monate in der Studie belassen werden. Durch Autopsie dieser Tiere soll festgestellt werden, ob sich, unabhängig vom Alterungsprozeß, prüfsubstanzbezogene pathologische Erscheinungsformen entwickelt haben.

#### Verfahren

##### Beobachtungen

Bei der täglichen Beobachtung der Tiere sollte insbesondere auf Veränderungen von Haut, Fell, Augen, Schleimhäuten, des Atmungs- und Kreislaufsystems, des autonomen und des Zentralnervensystems sowie auf Somatomotorik und Verhaltensmuster geachtet werden.

Die Tiere in der(den) behandelten Satellitengruppe(n) sollten in angemessenen Zeitabständen klinisch untersucht werden.

Eine regelmäßige Beobachtung der Tiere ist notwendig, um so weit wie möglich sicherzustellen, daß sich der Bestand an Tieren während der Studie nicht durch Kannibalismus, Autolyse der Gewebe bzw. Fehler beim Umsetzen der Tiere verringert. Moribunde Tiere sollten ausgesondert, getötet und seziiert werden.

Klinische Symptome, einschließlich neurologischer und Augenveränderungen sowie Mortalität sind für jedes Tier aufzuzeichnen. Die Entwicklung von Tumoren ist mit besonderer Aufmerksamkeit zu verfolgen; dabei sind der Zeitpunkt der Entstehung und Entwicklung toxischer Symptome ebenso aufzuzeichnen wie der Zeitpunkt der Entstehung, die Lokalisierung, das Ausmaß, das Erscheinungsbild und die Progression jedes deutlich sichtbaren oder fühlbaren Tumors festzuhalten.

Die Nahrungsaufnahme (und der Wasserverbrauch, sofern die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird), sind während der ersten dreizehn Wochen der Studie wöchentlich und anschließend in dreimonatigen Abständen zu bestimmen, sofern nicht der Gesundheitszustand oder das Körpergewicht der Tiere andere Maßnahmen erfordern.

Das Körpergewicht jedes Einzeltieres ist während der ersten dreizehn Wochen des Tests einmal wöchentlich und anschließend mindestens einmal alle vier Wochen aufzuzeichnen.

#### *Klinische Untersuchungen*

##### Hämatologische Untersuchung

Eine hämatologische Untersuchung (z. B. Hämoglobingehalt, Hämatokritwert, Gesamtzahl der roten Blutkörperchen, Gesamtzahl der weißen Blutkörperchen, Blutplättchen oder sonstige Messungen der Gerinnungsfähigkeit) der Blutproben von zehn Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen sollte nach drei Monaten, nach sechs Monaten und anschließend in etwa sechsmonatigen Abständen sowie nach Abschluß der Studie durchgeführt werden. Sofern durchführbar, sollten diese Blutproben bei jeder Untersuchung von der gleichen Ratte stammen.

Läßt die Beobachtung der Tiere im Verlauf der Studie auf eine Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes schließen, ist ein Differentialblutbild der erkrankten Tiere zu erstellen.

Das Differentialblutbild wird aus Blutproben von Tieren der höchsten Dosisgruppe und von Tieren aus den Kontrollgruppen erstellt. Für die Tiere der niedrigeren Dosisgruppe(n) ist die Erstellung eines Differentialblutbildes nur erforderlich, wenn zwischen der höchsten Dosisgruppe und der Kontrollgruppe erhebliche Abweichungen bestehen oder wenn die pathologische Untersuchung dies angezeigt erscheinen läßt.

##### Urinanalyse

Urinproben sind von zehn Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen möglichst in den gleichen zeitlichen Abständen wie bei der vorstehend beschriebenen hämatologischen Untersuchung zu entnehmen. Bei Nagern sollten die folgenden Analysen entweder bei jedem Einzeltier oder auf der Grundlage einer Sammelprobe/Geschlecht/Gruppe durchgeführt werden:

- Aussehen: Volumen und spezifisches Gewicht für jedes Einzeltier;
- Protein, Glukose, Ketone, Blut (semiquantitativ);
- Urinsediment (semiquantitativ).

##### Klinische Chemie

In etwa halbjährlichen Abständen und bei Abschluß der Untersuchung werden von allen Nichtnagern und von 10 Ratten/Geschlecht aus allen Dosisgruppen — wenn möglich jeweils von der gleichen Ratte — Blutproben zu klinisch-chemischen Messungen entnommen. Zusätzlich sollte vor Beginn des Versuchs von allen Nichtnagern eine Probe entnommen werden.

Mit dem aus diesen Proben gewonnenen Plasma werden folgende Analysen durchgeführt:

- Gesamtproteinkonzentration;
- Albuminkonzentration;
- Leberfunktionstests (wie alkalische Phosphatase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase <sup>(1)</sup> und Glutamat-Oxalazetat-Transaminase <sup>(2)</sup>), Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, Ornithin-Dekarboxylase;
- Kohlehydratstoffwechsel, z. B. Nüchternglukose;
- Nierenfunktionstest, z. B. Harnstickstoff im Blut.

<sup>(1)</sup> Neuerdings als Serum-Alanin-Aminotransferase bezeichnet.

<sup>(2)</sup> Neuerdings als Serum-Aspartat-Aminotransferase bezeichnet.

## Autopsie

An allen Tieren, einschließlich der während des Versuchs gestorbenen bzw. aus Krankheitsgründen getöteten Tiere, wird eine vollständige Autopsie vorgenommen. Zuvor sollten von allen Tieren Blutproben zur Erstellung eines Differentialblutbildes entnommen werden. Alle Gewebe mit makroskopischen Veränderungen, Tumoren oder tumorverdächtigen Veränderungen müssen fixiert werden. Man sollte versuchen, die Beobachtungen der Autopsiebefunde mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung zu korrelieren.

Alle Organe und Gewebe sind für die mikroskopische Untersuchung zu fixieren. Hierzu zählen gewöhnlich folgende Organe und Gewebe: Gehirn <sup>(1)</sup> (Medulla/Pons, Kleinhirn- und Großhirnrinde), Hypophyse, Schilddrüse (einschließlich Nebenschilddrüse), Thymus, Lungen (einschließlich Trachea), Herz, Aorta, Speicheldrüsen, Leber <sup>(1)</sup>, Milz, Nieren <sup>(1)</sup>, Nebennieren <sup>(1)</sup>, Oesophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Kolon, Rektum, Uterus, Harnblase, Lymphknoten, Pankreas, Gonaden <sup>(1)</sup>, akzessorische Geschlechtsorgane, weibliche Brustdrüse, Haut, Muskulatur, Nerven des peripheren Systems, Wirbelsäule (Hals-, Thorax-, Lendenbereich), Brustbein mit Knochenmark und Femur (einschließlich Gelenk) und Augen. Die Instillierung der Lungen und der Harnblase mit Fixierlösung stellt die optimale Konservierung dieser Gewebe dar; bei Inhalationsstudien ist eine derartige Aufblähung der Lungen Voraussetzung zur Durchführung einer geeigneten histopathologischen Untersuchung. Bei Spezialuntersuchungen wie Inhalationsstudien muß der gesamte Respirationstrakt, einschließlich Nase, Pharynx und Larynx untersucht werden.

Werden sonstige klinische Untersuchungen durchgeführt, sollten die daraus gewonnenen Ergebnisse vor der mikroskopischen Untersuchung vorliegen, da sie dem Pathologen wichtige Hinweise geben können.

## Histopathologie

Für den Studienabschnitt chronische Toxizität

Sämtliche asservierten Organe aller Tiere aus den Satellitengruppen mit hoher Dosierung und aus den Kontrollgruppen sind eingehend zu untersuchen. Werden in der Satellitengruppe mit hoher Dosierung prüfsubstanzbedingte pathologische Befunde festgestellt, müssen auch die Zielorgane aller übrigen Tiere in jeder anderen behandelten Satellitengruppe einer umfassenden und ausführlichen histologischen Untersuchung unterzogen werden. Die gleiche Untersuchung ist bei allen Tieren der behandelten Gruppen aus dem der Kanzerogenitätsbestimmung gewidmeten Teil der Studie vorzunehmen.

Für den Studienabschnitt Kanzerogenität

- a) Die Organe aller Tiere, die während des Tests sterben bzw. getötet werden sowie aller Tiere der Kontrollgruppen und der Gruppen mit hoher Dosierung, werden einer vollständigen histopathologischen Untersuchung unterzogen;
- b) alle Tumoren oder tumorverdächtigen Veränderungen an allen Organen sind in allen Dosisgruppen zu untersuchen;
- c) besteht zwischen der Gruppe mit der höchsten Dosierung und der Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit neoplastischer Veränderungen, so sollte das betreffende Organ bzw. Gewebe auch in den anderen Dosisgruppen einer histopathologischen Untersuchung unterzogen werden;
- d) ist die Überlebensrate in der Gruppe mit der höchsten Dosierung deutlich geringer als in der Kontrollgruppe, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen;
- e) lassen sich in der Gruppe mit der höchsten Dosierung toxische oder sonstige Wirkungen nachweisen, die ggf. Einfluß auf die Tumorentwicklung haben, ist die nächstniedrigere Dosisgruppe vollständig zu untersuchen.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Zahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Zahl der Tiere mit während des Tests festgestellten Tumoren oder Vergiftungserscheinungen, der Zeitpunkt der Feststellung und die Anzahl der Tiere, bei denen nach der Autopsie ein Tumor nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse sind durch ein geeignetes statistisches Verfahren zu bewerten. Hierzu eignet sich jede anerkannte statistische Methode.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

— Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung.

<sup>(1)</sup> Diese Organe sind von zehn Nagetieren pro Geschlecht/Gruppe zu wiegen.

— Versuchsbedingungen:

Beschreibung des Expositionsapparates

einschließlich Gestaltung, Typ, Abmessungen, Luftquelle, System zur Partikel- und Aerosolherzeugung, Klimatisierungssystem, Behandlung der Abluft und Art der Unterbringung der Tiere in einer Versuchskammer, sofern eine benutzt wird. Die Geräte zur Messung von Temperatur, Luftfeuchtigkeit und gegebenenfalls Stabilität der Aerosolkonzentration oder der Teilchengröße sind zu beschreiben.

Expositionsdaten

Diese Daten sind in tabellarischer Form unter Angabe von Mittelwerten und Berücksichtigung der Schwankung (z. B. Standardabweichung) zusammenzufassen. Sie müssen folgende Angaben enthalten:

- a) Luftdurchflußrate in der Inhalationsanlage;
  - b) Temperatur und Luftfeuchtigkeit;
  - c) nominale Konzentrationen (Gesamtmenge der Prüfsubstanz, die in die Inhalationsanlage eingegeben wird, dividiert durch das Luftvolumen);
  - d) gegebenenfalls Art des Vehikels;
  - e) tatsächliche Konzentration im Atembereich;
  - f) mittlere Teilchengröße (sofern erforderlich);
- Dosierungen (gegebenenfalls Vehikel, sofern benutzt) und Konzentrationen;
- Daten über die Häufigkeit von Tumoren, gegliedert nach Geschlecht, Dosierung und Art des Tumors;
- Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Versuchstiere, einschließlich der Tiere der Satellitengruppe, bis zum Abschluß des Versuchs überlebten;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung;
- Beschreibung toxischer oder anderer Wirkungen;
- Zeitpunkt der Beachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- ophthalmologische Befunde;
- Angaben über Futterverbrauch und Körpergewichtsentwicklung;
- hämatologische Tests und deren Ergebnisse;
- klinisch-chemische Tests und deren Ergebnisse (einschließlich einer evtl. Urinanalyse);
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse mit Beschreibung des angewandten Verfahrens;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.



## B. 34

### PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITÄT WÄHREND EINER GENERATION

#### 1. METHODE

##### 1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

##### 1.3. Bezugssubstanzen

Keine.

##### 1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen männlicher und weiblicher Versuchstiere in abgestuften Dosierungen verabreicht. Den männlichen Tieren wird die Prüfsubstanz während der Wachstumsperiode und mindestens eines vollständigen Spermatogenesezyklus (etwa 56 Tage bei der Maus und 70 Tage bei der Ratte) verabreicht, um auf diese Weise negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf die Sperminogenese feststellen zu können.

Den weiblichen Tieren der P-Generation wird die Prüfsubstanz während mindestens zweier vollständiger Oestruszyklen verabreicht, um negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf den Oestrus beurteilen zu können. Anschließend werden die Tiere verpaart. Während der Paarungszeit wird die Prüfsubstanz beiden Geschlechtern verabreicht, anschließend nur den weiblichen Tieren während der Gravidität und der Laktation. Bei inhalativer Exposition sind Änderungen der Methode erforderlich.

##### 1.5. Qualitätskriterien

Keine.

##### 1.6. Beschreibung der Methode

###### *Vorbereitungen*

Vor Testbeginn werden gesunde, junge, ausgewachsene Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Tiere werden dann für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen vor dem Test unter versuchsnahen Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen gehalten. Es wird empfohlen, die Prüfsubstanz mit dem Futter oder im Trinkwasser zu verabreichen. Andere Verabreichungswege sind ebenfalls zulässig. Während des eigentlichen Versuchsteils muß allen Tieren die Prüfsubstanz auf dem gleichen Wege appliziert werden. Wird eine Vehikel oder ein sonstiger Zusatz zur Erleichterung der Verabreichung benutzt, muß deren nichttoxische Wirkung gesichert sein. Die Verabreichung erfolgt an sieben Tagen pro Woche.

###### *Versuchstiere*

###### *Auswahl der Tierarten*

Bevorzugte Tierarten sind Ratte oder Maus. Tierstämme mit geringer Fruchtbarkeit sind auszuschließen und nur gesunde Tiere, die bisher noch keinen Versuchen unterzogen worden waren, einzusetzen. Die Versuchstiere sind nach Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter auszuwählen.

Um die Fruchtbarkeit ausreichend beurteilen zu können, müssen sowohl männliche als auch weibliche Tiere untersucht werden. Alle Versuchs- und Kontrolltiere müssen vor Verabreichung der Prüfsubstanz vom Muttertier entwöhnt sein.

###### *Anzahl und Geschlecht*

Jede Versuchstier- und Kontrollgruppe muß so viele Tiere enthalten, daß darin etwa 20 trächtige Weibchen kurz vor bzw. zum Zeitpunkt der Geburt enthalten sind.

Auf diese Weise soll gewährleistet werden, daß genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotentials der Prüfsubstanz für die Fertilität, Schwangerschaft, Verhalten des Muttertieres in der P-Generation sowie Säugen, Wachstum und Entwicklung der F<sub>1</sub>-Generation von der Konzeption bis zum Absetzen vom Muttertier vornehmen zu können.

#### Versuchsbedingungen

Futter und Wasser ist den Tieren *ad libitum* bereitzustellen. Kurz vor dem Geburtstermin werden die trächtigen Weibchen einzeln in Geburtskäfigen untergebracht, die gegebenenfalls mit Nestmaterial ausgestattet sind.

#### Dosierungen

Es sollten mindestens drei Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingesetzt werden. Wird ein Vehikel benutzt, muß die Kontrollgruppe das in der höchsten Dosierung applizierte Volumen erhalten. Wird die Nahrungsaufnahme oder -verwertung durch die Prüfsubstanz beeinträchtigt, könnte der Einsatz einer entsprechend restriktiv gefütterten Kontrollgruppe sinnvoll sein. Sofern die physikalisch-chemischen Eigenschaften bzw. die biologische Wirkungsweise der Prüfsubstanz es zulassen, sollte die höchste Dosierung möglichst so gewählt werden, daß bei den Elterntieren (P) zwar Vergiftungserscheinungen auftreten, aber keine Mortalität verursacht wird. Im günstigsten Falle sollte(n) die mittlere(n) Dosierung(en) minimale prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen bewirken, die niedrigste Dosierung hingegen weder bei den Elterntieren noch bei den Nachkommen feststellbare negative Auswirkungen zeigen. Wird die Prüfsubstanz per Morgensonde oder in Form von Kapseln verabreicht, muß die jeweilige Dosis entsprechend dem Körpergewicht unter Berücksichtigung der Veränderungen des Körpergewichts wöchentlich angepaßt werden. Während der Gravidität kann die Dosierung bei den weiblichen Tieren entweder aufgrund des Körpergewichts am Tag 0 oder am Tag 6 der Gravidität bestimmt werden.

#### Limit-Test

Wenn im Falle einer Prüfsubstanz mit geringer Toxizität eine Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht nachweisbar keinen Einfluß auf die Reproduktionsfähigkeit hat, sind Untersuchungen mit anderen Dosierungen nicht notwendig. Konnten in einer Vorstudie mit hoher Dosierung, die eindeutige, prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen beim Muttertier hervorrief, keinerlei nachteilige Auswirkungen auf die Fertilität festgestellt werden, können auch hier Untersuchungen mit anderen Dosierungen als nicht notwendig erachtet werden.

#### Versuchsdurchführung

##### Vorgehensweise

Die tägliche Verabreichung der Prüfsubstanz an die männlichen Elterntiere (P) sollte nach der Entwöhnung vom Muttertier und einer mindestens 5tägigen Akklimatisierung im Alter von 5 bis 9 Wochen beginnen. Bei den Ratten wird die Applikation für weitere 10 Wochen (bei Mäusen 8 Wochen) bis zur Paarungszeit fortgesetzt. Die männlichen Tiere werden nach der Verpaarung entweder getötet und untersucht oder weiterhin bei der Versuchsdiet belassen, um gegebenenfalls zur Erzeugung eines zweiten Wurfs zur Verfügung zu stehen, sollten jedoch noch vor Abschluß der Studie getötet und untersucht werden. Die weiblichen Elterntiere (P) erhalten die Prüfsubstanz nach einer mindestens 5tägigen Akklimatisierung bis mindestens 2 Wochen vor der Paarung. Die Behandlung der P-Weibchen wird während der 3wöchigen Paarungszeit, der gesamten Gravidität bis zur Entwöhnung der F<sub>1</sub>-Nachkommen fortgesetzt. Eine Änderung des Verabreichungsschemas kann aufgrund sonstiger verfügbarer Informationen über die Prüfsubstanz, z. B. über Stoffwechselmechanismen oder Bioakkumulation, erforderlich sein.

##### Verpaarung

Bei Reproduktionsstudien über die toxikologischen Auswirkungen kann die Verpaarung entweder im Verhältnis 1:1 (ein männliches und ein weibliches Tier) oder 1:2 (ein männliches und zwei weibliche Tiere) erfolgen.

Bei der 1:1-Verpaarung wird das weibliche mit einem männlichen Tier bis zum Eintritt der Gravidität oder bis nach Ablauf von 3 Wochen zusammengebracht. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfropfe untersucht. Als Tag 0 der Gravidität gilt der Tag, an dem Vaginalpfropfe oder Sperma festgestellt werden konnte.

Bei erfolgloser Verpaarung sollten die entsprechenden Tiere zur Beurteilung der Ursache für die Unfruchtbarkeit untersucht werden. Dies bedeutet gegebenenfalls eine weitere Verpaarung mit einem Tier mit nachgewiesener Fruchtbarkeit, die mikroskopische Untersuchung der Reproduktionsorgane und die Untersuchung der Oestruszyklen oder der Spermio-genese.

##### Wurfgrößen

Die während der Fruchtbarkeitsstudie behandelten Tiere können ihre Jungen auf natürlichem Wege zur Welt bringen und ohne jeden äußeren Eingriff bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung großziehen.

Soll die Anzahl der geworfenen Jungtiere reduziert werden, wird folgendes Verfahren vorgeschlagen: Zwischen Tag 1 und Tag 4 nach der Geburt werden aus jedem Wurf so viele Jungtiere ausgesondert, bis möglichst 4 männliche und 4 weibliche Tiere verbleiben. Ist es aufgrund der Geschlechter-Verteilung nicht möglich, in jedem Wurf 4 männliche und 4 weibliche Junge zu belassen, so ist eine partielle Anpassung zulässig (z. B. 5 männliche und 3 weibliche Tiere). Für Würfe mit weniger als 8 Jungtieren gilt diese Anpassung nicht.

## Beobachtungen

Während der gesamten Testperiode werden die Tiere mindestens einmal täglich beobachtet. Auffallende Verhaltensstörungen, Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt, alle Vergiftungserscheinungen, einschließlich Mortalität, sind aufzuzeichnen. Vor und während der Paarungszeit ist die Futteraufnahme wöchentlich zu bestimmen. Wahlweise kann die tägliche Bestimmung der Nahrungsaufnahme auch während der Gravidität durchgeführt werden. Nach der Geburt und während der Stillperiode soll die Bestimmung der Nahrungsaufnahme (und der Wasseraufnahme, sofern die Prüfsubstanz mit dem Trinkwasser verabreicht wird, am gleichen Tag wie das Wiegen der Jungtiere erfolgen. Männliche und weibliche Tiere der P-Generation müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen werden. Die Beobachtungen sind für jedes erwachsene Tier einzeln aufzuzeichnen.

Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet. Jeder Wurf ist sobald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um die Anzahl und das Geschlecht der Nachkommen, Lebend- und Totgeburten und auffallende Anomalien feststellen zu können.

Tote und am Tag 4 getötete Jungtiere müssen asserviert und auf mögliche Fehlbildungen untersucht werden. Die lebendgeborenen Jungtiere werden gezählt und der gesamte Wurf und die einzelnen Tiere am Morgen nach der Geburt, an den Tagen 4 und 7 und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen. Bei den Muttertieren oder den Nachkommen zu beobachtende körperliche Anomalien oder Verhaltensstörungen müssen aufgezeichnet werden.

## Pathologie

### Autopsie

Die Tiere der P-Generation sollten zum Zeitpunkt der Tötung bzw. bei Eintritt des Todes während der Studie makroskopisch auf Anomalien oder pathologische Veränderungen, unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzungsorgane, untersucht werden. Auch tote oder kranke Jungtiere sind auf Fehlbildungen zu untersuchen.

### Histopathologie

Eierstöcke, Uterus, Zervix, Vagina, Hoden, Nebenhoden, Samenbläschen, Prostata, Koagulationsdrüse, Hirnanhangdrüse und Zielorgan(e) aller Tiere der P-Generation werden für die mikroskopische Untersuchung asserviert. Sollten diese Organe bisher nicht im Rahmen einer sonstigen Studie mit Mehrfachdosierung untersucht worden sein, ist in allen Versuchstiergruppen mit hoher Dosierung, bei den Kontrolltieren und den während der Studie gestorbenen Tieren — sofern durchführbar — eine mikroskopische Untersuchung vorzunehmen.

Alle Organe, die bei dieser Untersuchung pathologische Veränderungen aufweisen, müssen anschließend ebenfalls bei allen übrigen Tieren der P-Generation untersucht werden. In diesem Fall sollte eine mikroskopische Untersuchung aller Gewebe mit auffallenden pathologischen Veränderungen erfolgen.

Wie bereits im Abschnitt über die Verpaarung vorgeschlagen, sollten die Fortpflanzungsorgane aller Tiere bei Verdacht auf Unfruchtbarkeit mikroskopischen Untersuchungen unterzogen werden.

## 2. DATEN

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Anzahl der fruchtbaren männlichen Tiere, die Anzahl der trächtigen Weibchen, die jeweilige Art der Veränderungen und der Prozentsatz der Tiere mit der jeweiligen Veränderung.

Sofern möglich, sollten die numerischen Ergebnisse anhand eines geeigneten statistischen Verfahrens bewertet werden. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendete Tierarten/Tierstamm;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und Lebensfähigkeit;

- Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Tiere bis zur geplanten Tötung bzw. zum Abschluß der Studie überlebten;
- Tabelle mit Gewichtsangaben für jeden Wurf, das durchschnittliche Gewicht der Jungtiere sowie das individuelle Gewicht der Jungtiere bei Abschluß der Studie;
- toxische oder andere Auswirkungen auf die Reproduktion, die Nachkommenschaft, das postnatale Wachstum, usw.;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Körpergewicht der Tiere der P-Generation;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung der mikroskopischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

PRÜFUNG AUF REPRODUKTIONSTOXIZITÄT WÄHREND ZWEIER GENERATIONEN

1. METHODE

1.1. Einleitung

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.2. Definitionen

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

1.3. Bezugsubstanzen

Keine.

1.4. Prinzip der Methode

Die Prüfsubstanz wird mehreren Gruppen männlicher und weiblicher Versuchstiere in abgestuften Dosierungen verabreicht. Den männlichen Tieren der P-Generation wird die Prüfsubstanz während der Wachstumsperiode und mindestens eines vollständigen Spermatogenesezyklus (etwa 56 Tage bei der Maus und 70 Tage bei der Ratte) verabreicht, um auf diese Weise negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf die Spermiogenese feststellen zu können.

Den weiblichen Tieren der P-Generation wird die Prüfsubstanz während mindestens zweier vollständiger Oestruszyklen verabreicht, um negative Wirkungen der Prüfsubstanz auf den Oestrus beurteilen zu können. Die Verabreichung der Prüfsubstanz erfolgt auch während der Entwöhnungsphase der F<sub>1</sub>-Nachkommenschaft, während deren gesamter Wachstumsperiode, der Paarungszeit und der Erzeugung der F<sub>2</sub>-Generation bis zur Entwöhnung der F<sub>2</sub>-Nachkommen. Bei inhalativer Exposition sind Änderungen des Verfahrens erforderlich.

1.5. Qualitätskriterien

Keine.

1.6. Beschreibung der Methode

*Vorbereitungen*

Vor Testbeginn werden gesunde, junge, ausgewachsene Tiere randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Tiere der P-Generation werden dann für einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen vor dem Test unter versuchsnahen Unterbringungs- und Fütterungsbedingungen gehalten. Es wird empfohlen, die Prüfsubstanz mit dem Futter oder im Trinkwasser zu verabreichen. Andere Verabreichungswege sind ebenfalls zulässig. Während des eigentlichen Versuchs muß allen Tieren die Prüfsubstanz auf dem gleichen Wege appliziert werden. Wird ein Vehikel oder ein sonstiger Zusatz zur Erleichterung der Verabreichung benutzt, muß deren nichttoxische Wirkung gesichert sein. Die Verabreichung erfolgt an sieben Tagen pro Woche.

*Versuchstiere: Auswahl der Tierarten*

Bevorzugte Tierarten sind Ratte oder Maus. Es sind gesunde Tiere der P-Generation, die bisher noch keinem Versuch unterzogen wurden, einzusetzen. Die Versuchstiere sind in bezug auf Tierart, Tierstamm, Geschlecht, Gewicht und/oder Alter auszuwählen.

Um die Fruchtbarkeit ausreichend beurteilen zu können, müssen sowohl männliche als auch weibliche Tiere untersucht werden. Alle Versuchs- und Kontrolltiere müssen vor Verabreichung der Prüfsubstanz vom Muttertier entwöhnt sein.

*Anzahl und Geschlecht*

Jede Versuchstier- und Kontrollgruppe muß so viele Tiere enthalten, daß darin etwa 20 trächtige Weibchen kurz vor bzw. zum Zeitpunkt der Geburt enthalten sind. Auf diese Weise soll gewährleistet werden, daß genügend Graviditäten und Nachkommen erzeugt werden, um eine aussagekräftige Bewertung des Schädigungspotentials

der Prüfsubstanz für die Fertilität, Schwangerschaft, Verhalten des Muttertieres, Säugen, Wachstum und Entwicklung der F<sub>1</sub>-Generation von der Konzeption bis zur Geschlechtsreife, einschließlich der Entwicklung der F<sub>2</sub>-Generation bis zum Absetzen vom Muttertier zu ermöglichen.

#### *Versuchsbedingungen*

Futter und Wasser ist den Tieren *ad libitum* bereitzustellen. Kurz vor dem Geburtstermin werden die trächtigen Weibchen einzeln in Geburtskäfigen untergebracht, die gegebenenfalls mit Nestmaterial ausgestattet sind.

#### *Dosierungen*

Es sollten mindestens drei Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingesetzt werden. Wird ein Vehikel benutzt, muß die Kontrollgruppe das in der höchsten Dosierung applizierte Volumen erhalten. Wird die Nahrungsaufnahme oder -verwertung durch die Prüfsubstanz beeinträchtigt, könnte der Einsatz einer entsprechend restriktiv gefütterten Kontrollgruppe sinnvoll sein. Sofern die physikalisch-chemischen Eigenschaften bzw. die biologische Wirkungsweise der Prüfsubstanz es zulassen, sollte die höchste Dosierung möglichst so gewählt werden, daß bei den Elterntieren zwar Vergiftungserscheinungen auftreten, aber keine Mortalität verursacht wird. Im günstigsten Falle sollte(n) die mittlere(n) Dosierung(en) minimale prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen bewirken, die niedrigste Dosierung hingegen weder bei den Erzeugertieren noch bei der Nachkommenschaft feststellbare negative Auswirkungen zeigen. Wird die Prüfsubstanz per Magensonde oder in Form von Kapseln verabreicht, muß die jeweilige Dosis entsprechend dem Körpergewicht unter Berücksichtigung der Veränderungen des Körpergewichts wöchentlich angepaßt werden. Bei den weiblichen Tieren kann während der Gravidität die Dosierung entweder aufgrund des Körpergewichts am Tag 0 oder am Tag 6 der Gravidität bestimmt werden.

#### *Limit-Test*

Wenn im Falle einer Prüfsubstanz mit geringer Toxizität eine Dosierung von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht nachweisbar keinen Einfluß auf die Reproduktionsfähigkeit hat, sind Untersuchungen mit anderen Dosierungen nicht notwendig. Konnten in der Vorstudie mit hoher Dosierung, die eindeutige, prüfsubstanzbedingte Vergiftungserscheinungen beim Muttertier hervorrief, keinerlei nachteilige Auswirkungen auf die Fertilität festgestellt werden, können auch hier Untersuchungen mit anderen Dosierungen als nicht notwendig erachtet werden.

#### *Versuchsdurchführung*

##### *Vorgehensweise*

Die tägliche Verabreichung der Prüfsubstanz an die männliche Parentalgeneration (P) sollte nach der Entwöhnung vom Muttertier und einer mindestens Stägigen Akklimatisierung im Alter von 5 bis 9 Wochen beginnen. Bei den Ratten wird die Applikation für weitere 10 Wochen (bei Mäusen 8 Wochen) bis zur Verpaarung fortgesetzt. Die männlichen Tiere werden nach der Verpaarung entweder getötet und untersucht oder weiterhin bei der Versuchsdiät belassen, um gegebenenfalls zur Erzeugung eines zweiten Wurfs zur Verfügung zu stehen, sollten jedoch noch vor Abschluß des gesamten Versuchs getötet und untersucht werden.

Die weiblichen Elterntiere erhalten die Prüfsubstanz nach einer mindestens Stägigen Akklimatisierung bis mindestens 2 Wochen vor der Paarung. Die tägliche Behandlung der P-Weibchen erfolgt während der 3wöchigen Paarungszeit, der gesamten Gravidität und wird bis zur Entwöhnung der F<sub>1</sub>-Nachkommen fortgesetzt. Eine Änderung des Verabreichungsschemas kann aufgrund sonstiger verfügbarer Informationen über die Prüfsubstanz, z. B. über Stoffwechselmechanismen oder Bioakkumulation, erforderlich sein.

Die Behandlung der F<sub>1</sub>-Tiere beginnt mit der Entwöhnung und endet mit ihrer Tötung.

##### *Verpaarung*

Bei Reproduktionsstudien über die toxikologischen Auswirkungen kann die Verpaarung entweder im Verhältnis 1:1 (ein männliches und ein weibliches Tier) oder 1:2 (ein männliches und zwei weibliche Tiere) erfolgen.

Bei der 1:1-Verpaarung wird das weibliche mit einem männlichen Tier bis zum Eintritt der Gravidität oder bis nach Ablauf von 3 Wochen zusammengebracht. Jeden Morgen werden die weiblichen Tiere auf Sperma oder Vaginalpfropfe untersucht. Als Tag 0 der Gravidität gilt der Tag, an dem Vaginalpfropfe oder Sperma festgestellt werden konnte.

Unter Berücksichtigung der Spermio-genese sollten die F<sub>1</sub>-Nachkommen frühestens im Alter von 11 Wochen (Maus) bzw. 13 Wochen (Ratte) verpaart werden. Für die Verpaarungen der F<sub>1</sub>-Generation werden aus jedem Wurf willkürlich ein männliches und ein weibliches Tier ausgewählt und zur kreuzweisen Verpaarung mit einem Jungtier eines anderen Wurfs aus der gleichen Dosisgruppe zusammengebracht. Die nicht für eine Verpaarung vorgesehenen männlichen und weiblichen F<sub>1</sub>-Tiere werden nach der Entwöhnung vom Muttertier getötet.

Bei erfolgloser Verpaarung sollten die entsprechenden Tiere zur Beurteilung der Ursache für die Unfruchtbarkeit untersucht werden. Dies bedeutet gegebenenfalls eine weitere Verpaarung mit einem Tier mit nachgewiesener Fruchtbarkeit, eine mikroskopische Untersuchung der Fortpflanzungsorgane und eine Untersuchung der Oestruszyklen oder der Spermio-genese.

#### Wurfgröße

Die während der Fruchtbarkeitsstudie behandelten Tiere können ihre Jungen auf natürlichem Wege zur Welt bringen und ohne jeden äußeren Eingriff bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung großziehen.

Soll die Anzahl der geworfenen Jungtiere reduziert werden, wird folgendes Verfahren vorgeschlagen: Zwischen Tag 1 und Tag 4 nach der Geburt werden aus jedem Wurf so viele Jungtiere ausgesondert, bis möglichst 4 männliche und 4 weibliche Tiere verbleiben. Ist es aufgrund der Geschlechter-Verteilung nicht möglich, in jedem Wurf 4 männliche und 4 weibliche Junge zu belassen, so ist eine partielle Anpassung zulässig (z. B. 5 männliche und 3 weibliche Tiere). Für Würfe mit weniger als 8 Jungtieren gilt diese Anpassung nicht. Bei den Jungtieren der F<sub>2</sub>-Generation ist in gleicher Weise vorzugehen.

#### Beobachtungen

Während der gesamten Testperiode werden die Tiere mindestens einmal täglich beobachtet. Auffallende Verhaltensstörungen, Anzeichen einer schweren oder verzögerten Geburt, alle Vergiftungserscheinungen, einschließlich Mortalität, sind aufzuzeichnen. Vor und während der Paarungszeit ist die Futteraufnahme wöchentlich zu ermitteln. Wahlweise kann die tägliche Bestimmung der Nahrungsaufnahme auch während der Gravidität durchgeführt werden. Nach der Geburt und während der Stillperiode soll die Bestimmung der Nahrungsaufnahme am gleichen Tag wie das Wiegen der Jungtiere erfolgen. Die Elterntiere (P- und F<sub>1</sub>-Generation) müssen am ersten Tag der Behandlung und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen werden. Die Beobachtungen sind für jedes erwachsene Tier einzeln aufzuzeichnen.

Die Trächtigkeitsdauer wird vom Tag 0 der Gravidität an berechnet. Jeder Wurf ist sobald wie möglich nach der Geburt zu untersuchen, um Anzahl und Geschlecht der Nachkommen, Lebend- und Totgeburten und auffallende Anomalien feststellen zu können.

Tote und am Tag 4 getötete Jungtiere müssen asserviert und auf mögliche Fehlbildungen hin untersucht werden. Die lebendgeborenen Jungtiere werden gezählt und der gesamte Wurf und die einzelnen Tiere am Morgen nach der Geburt, an den Tagen 4 und 7 und anschließend in wöchentlichen Abständen gewogen, und zwar bis zum Abschluß der Untersuchung, wenn die Tiere einzeln gewogen werden. Bei den Muttertieren oder den Nachkommen zu beobachtende körperliche Anomalien oder Verhaltensstörungen müssen aufgezeichnet werden.

#### Pathologie

##### Autopsie

Alle erwachsenen Tiere der P- und der F<sub>1</sub>-Generation werden getötet, wenn die Beurteilung der Reproduktionsfähigkeit abgeschlossen ist. Die nicht für die Paarung ausgewählten F<sub>1</sub>-Nachkommen und alle F<sub>2</sub>-Nachkommen werden nach der Entwöhnung getötet.

Die Elterntiere (P- und F<sub>1</sub>-Generation) sollten zum Zeitpunkt der Tötung bzw. bei Eintritt des Todes während der Studie mikroskopisch auf Anomalien oder pathologische Veränderungen, unter besonderer Berücksichtigung der Fortpflanzungsorgane, untersucht werden. Auch tote oder kranke Jungtiere sind auf Fehlbildungen zu untersuchen.

#### Histopathologie

Eierstöcke, Uterus, Cervix, Vagina, Hoden, Nebenhoden, Samenbläschen, Koagulationsdrüse, Prostata, Hirnanhangdrüse und Zielorgan(e) aller für die Verpaarung ausgewählten Tiere der P- und F<sub>1</sub>-Generation werden, sofern erforderlich, für die mikroskopische Untersuchung asserviert. Sollten diese Organe bisher nicht im Rahmen einer sonstigen Studie mit Mehrfachdosierung untersucht worden sein, ist in allen Versuchtstiergruppen mit hoher Dosierung, bei den Kontrolltieren der P-Generation und den für die Fortpflanzung ausgewählten Tieren der F<sub>1</sub>-Generation sowie an den während der Studie gestorbenen Tieren — sofern durchführbar — eine mikroskopische Untersuchung vorzunehmen. Alle Organe, die bei dieser Untersuchung pathologische Veränderungen aufweisen, müssen anschließend ebenfalls bei allen übrigen Tieren der anderen Dosisgruppen untersucht werden. In diesem Fall sollte eine mikroskopische Untersuchung aller Gewebe mit auffallenden pathologischen Veränderungen erfolgen. Wie bereits im Abschnitt über die Verpaarung vorgeschlagen, sollten die Fortpflanzungsorgane aller Tiere bei Verdacht auf Unfruchtbarkeit einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen werden.

2. **DATEN**

*Auswertung der Ergebnisse*

Die Daten sind in tabellarischer Form zusammenzufassen. Daraus müssen für jede Versuchsgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der Tiere zu Beginn des Versuchs, die Anzahl der fruchtbaren männlichen Tiere, die Anzahl der trächtigen Weibchen, die jeweilige Art der Veränderungen und der Prozentsatz der Tiere mit der jeweiligen Veränderung.

Sofern möglich, sollten die numerischen Ergebnisse anhand eines geeigneten statistischen Verfahrens bewertet werden. Hierzu ist eine anerkannte statistische Methode heranzuziehen.

3. **ABSCHLUSSBERICHT**

3.1. **Prüfbericht**

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- verwendete Tierarten/Tierstamm;
- Daten über toxische Reaktionen nach Geschlecht und Dosierung, einschließlich Fruchtbarkeit, Trächtigkeit und Lebensfähigkeit;
- Zeitpunkt des Todes während der Studie bzw. Angabe, ob die Tiere bis zum Abschluß des Versuchs überlebten;
- Tabelle mit Gewichtsangaben für jeden Wurf, das mittlere Gewicht der Jungtiere sowie das individuelle Gewicht der Jungtiere bei Abschluß der Studie;
- toxische oder andere Auswirkungen auf die Reproduktion, die Nachkommenschaft, das postnatale Wachstum, usw.;
- Zeitpunkt der Beobachtung der jeweiligen Vergiftungssymptome und deren weiterer Verlauf;
- Körpergewicht der für die Verpaarung ausgewählten P- und F<sub>1</sub>-Tiere;
- Sektionsbefunde;
- detaillierte Beschreibung der mikroskopischen Befunde;
- statistische Auswertung der Ergebnisse, sofern möglich;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATUR**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.



**B. 36**  
**TOXIKOKINETIK**

**1. METHODE**

**1.1. Einleitung**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.2. Definitionen**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

**1.3. Bezugssubstanzen**

Keine.

**1.4. Prinzip der Methode**

Die Prüfsubstanz wird auf einem geeigneten Weg verabreicht. Je nach Zweck der Untersuchung kann die Substanz einmalig oder in bestimmten Zeitabständen wiederholter Dosierung einer oder mehreren Gruppen von Versuchstieren verabreicht werden. Anschließend werden je nach Art der Untersuchung die Substanz und/oder ihre Metaboliten in den Körperflüssigkeiten, Gewebe und/oder Ausscheidungen bestimmt.

Die Untersuchungen können mit „unmarkierter“ oder „markierter“ Prüfsubstanz erfolgen. Wird eine radioaktive Markierung verwendet, sollte sie in der Substanz in der Form enthalten sein, daß sie möglichst viele Informationen über das Schicksal der Verbindung liefert.

**1.5. Qualitätskriterien**

Keine.

**1.6. Beschreibung der Methode**

*Vorbereitung*

Gesunde, junge, ausgewachsene Tiere werden mindestens 5 Tage vor dem Versuch an die Laborbedingungen akklimatisiert. Vor Beginn des Versuches werden die Tiere randomisiert und in Behandlungsgruppen eingeteilt. Für bestimmte Fragestellungen können sehr junge, trächtige oder vorbehandelte Tiere verwendet werden.

*Versuchsbedingungen*

*Versuchstiere*

Toxikokinetische Untersuchungen können an einer oder mehreren geeigneten Tierarten durchgeführt werden. Hierbei ist zu berücksichtigen, ob diese Tierarten in anderen toxikologischen Untersuchungen mit der gleichen Substanz verwendet wurden oder verwendet werden sollen. Dienen Nager als Versuchstiere, sollten die Gewichtsschwankungen  $\pm 20\%$  vom Durchschnittsgewicht nicht überschreiten.

*Anzahl und Geschlecht*

Für die Untersuchungen zu Absorption und Exkretion sollte jede Dosierungsgruppe zu Beginn 4 Tiere umfassen. Eine geschlechtsspezifische Auswahl ist nicht erforderlich, doch kann es unter bestimmten Umständen notwendig sein, beide Geschlechter zu untersuchen. Treten geschlechtsspezifische Unterschiede auf, sollten vier Tiere beider Geschlechter untersucht werden. Bei Untersuchungen an Nicht-Nagern reicht auch eine geringere Anzahl von Tieren aus.

Für die Untersuchung zur Verteilung sollten bei der Festlegung der anfänglichen Gruppengröße sowohl die Anzahl der zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten zu tödenden Tiere als auch die Anzahl der Untersuchungszeitpunkte berücksichtigt werden.

Für die Untersuchung zum Metabolismus ist die Zahl der Tiere pro Gruppe entsprechend zu erhöhen.

Bei Untersuchungen mit mehreren Dosierungen und mehreren Untersuchungszeitpunkten sind bei der Festlegung der Zahl der Tiere die Anzahl der Untersuchungszeitpunkte und geplanten Tötungen zu berücksichtigen. Jede Gruppe pro Zeitpunkt der Untersuchung muß jedoch aus mindestens 2 Tieren bestehen. Die Zahl der Tiere sollte ausreichen, um hinlängliche Informationen über Aufnahme, Plateau und Abnahme (je nach Bedarf) der Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten zu liefern.

#### Dosierungen

Bei einmaliger Verabreichung sind mindestens zwei Dosierungen zu wählen: eine niedrige Dosierung, bei der keine toxischen Wirkungen zu beobachten sind und eine hohe Dosierung, bei der Veränderung der toxikokinetischen Parameter auftreten können oder bei der eine toxische Wirkung eintritt.

Bei mehrmaliger Verabreichung reicht die niedrige Dosis normalerweise aus, doch kann unter bestimmten Umständen auch eine hohe Dosis erforderlich sein.

#### Verabreichungsweg

Bei den toxikokinetischen Untersuchungen ist der gleiche Verabreichungsweg und ggf. das gleiche Vehikel zu verwenden wie bei anderen schon durchgeführten oder geplanten Toxizitätsuntersuchungen. Die Prüfsubstanz wird im allgemeinen den Versuchstieren in festgelegten Zeiträumen oral mit einer Magensonde oder im Futter, durch Inhalation oder dermal verabreicht. Die intravenöse Verabreichung der Prüfsubstanz kann zur Bestimmung der relativen Absorptionsrate bei einer anderen Applikationsroute sinnvoll sein. Außerdem lassen sich bald nach der intravenösen Verabreichung einer Prüfsubstanz Informationen über das Verteilungsmuster ermitteln.

Die Möglichkeit einer Interferenz zwischen Vehikel und Prüfsubstanz ist zu berücksichtigen. Es ist darauf zu achten, ob die Absorptionsrate bei Verabreichung der Prüfsubstanz mit der Magensonde Unterschiede im Vergleich zur Verabreichung im Futter aufweist und daß die Dosis genau bestimmt wird, vor allem bei Verabreichung der Prüfsubstanz im Futter. Die Dosierung — vor allem bei Verabreichung der Prüfsubstanz im Futter — muß genau bestimmt werden können.

#### Beobachtungszeitraum

Alle Tiere sind täglich zu beobachten; Zeichen von Toxizität sowie relevante klinische Beobachtungen und deren Beginn, Ausmaß und Dauer sind aufzuzeichnen.

#### Verfahren

Nach Feststellen des Körpergewichtes der Versuchstiere wird die Prüfsubstanz auf geeignetem Wege verabreicht. Falls erforderlich, sollten die Tiere die Prüfsubstanz nüchtern erhalten.

#### Absorption

Geschwindigkeit und Ausmaß der Absorption der verabreichten Substanz lassen sich mit verschiedenen Methoden mit und ohne Referenzgruppen<sup>(1)</sup> bestimmen, z. B. durch:

- Bestimmung der Menge der Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten in den Exkreten, z. B. im Urin, Gallenflüssigkeit, Faezes, Atemluft sowie im Körper der getöteten Tiere;
- Vergleich der biologischen Wirkung (z. B. Untersuchungen zur akuten Toxizität) bei Versuchs- und Kontroll- und/oder Referenzgruppen;
- Vergleich der über die Nieren ausgeschiedenen Substanz und/oder ihrer Metaboliten bei Versuchs- und Referenzgruppen;
- Bestimmung der Fläche unter der Plasma-Spiegel-Kurve der Prüfsubstanz und/oder ihrer Metaboliten und deren Vergleich mit Daten von Referenzgruppen.

<sup>(1)</sup> Bei der Referenzgruppe handelt es sich um eine Gruppe, der die Prüfsubstanz auf einem anderen Wege verabreicht wird und die die vollständige Verfügbarkeit der Dosis gewährleistet.

### Verteilung

Zur Analyse der Verteilungsmuster stehen derzeit zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die einzeln oder gemeinsam eingesetzt werden können:

- qualitative Informationen liefern Ganzkörper-Autoradiographieverfahren;
- quantitative Informationen erhält man durch Tötung der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Exposition und Bestimmung von Konzentration und Menge der Prüfsubstanz und/oder ihrer Stoffwechselprodukte in Geweben und Organen.

### Exkretion

Bei den Exkretionsuntersuchungen werden Urin, Faezes und Atemluft und — unter bestimmten Umständen — Gallenflüssigkeit gesammelt. Die Menge der Prüfsubstanz und/oder ihrer Stoffwechselprodukte in diesen Ausscheidungen ist zu verschiedenen Zeiten nach der Exposition zu messen, bis etwa 95 % der verabreichten Dosis ausgeschieden wurde (höchstens jedoch sieben Tage lang).

In besonderen Fällen kann es notwendig sein, auch die Exkretion der Prüfsubstanz in der Milch säugender Versuchstiere zu berücksichtigen.

### Stoffwechsel

Zur Bestimmung von Stoffwechselintensität und -muster sind biologische Proben durch geeignete Verfahren zu analysieren. Wenn sich aus vorangegangenen toxikologischen Untersuchungen Fragen ergeben, dann sind Strukturen von Metaboliten zu klären und entsprechende Stoffwechselwege aufzuzeigen. *In vitro*-Untersuchungen können sich zur Ermittlung von Informationen über Stoffwechselwege als nützlich erweisen.

Weitere Angaben über die Beziehung zwischen Stoffwechsel und Toxizität können biochemische Untersuchungen liefern, z. B. die Bestimmung der Beeinflussung metabolisierender Enzymsysteme, die Abnahme endogener Nicht-Eiweißartiger-Sulphydryl-Verbindungen und die Bindung der Substanz an Makromoleküle.

## 2. DATEN

Je nach Art der durchgeführten Untersuchung sind die Daten in tabellarischer Form, ggf. ergänzt durch graphische Darstellungen, zusammenzufassen. Soweit sinnvoll, sind für jede Versuchsgruppe die durchschnittlichen und statistischen Schwankungen in Relation zu Zeit, Dosierung, Gewebe und Organen anzugeben. Absorptionsrate und Ausscheidungsmenge und -Geschwindigkeit sind durch geeignete Verfahren zu bestimmen. Bei Stoffwechseluntersuchungen ist die Struktur der ermittelten Metaboliten anzugeben; mögliche Stoffwechselwege sind aufzuzeichnen.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

### 3.1. Prüfbericht

Im Prüfbericht ist, wenn möglich, folgendes anzugeben:

- Tierarten, Tierstamm, Herkunft, Haltungsbedingungen, Fütterung;
- Merkmale der markierten Stoffe, sofern verwendet;
- Dosierungen und zeitliche Abstände zwischen den Verabreichungen;
- Verabreichungsweg(e) und evtl. verwendete Vehikel;
- toxische und andere beobachtete Wirkungen;
- Verfahren zur Bestimmung der Prüfsubstanz und/oder ihrer Stoffwechselprodukte in biologischen Proben einschließlich Atemluft;
- tabellarische Darstellung der Messungen nach Geschlecht, Dosierung, Futter, Zeit, Geweben und Organen;

- Angaben über Absorptionsrate und Exkretion über die Zeit;
- Verfahren zur Beschreibung und Identifizierung von Stoffwechselprodukten in biologischen Proben;
- Verfahren für biologische Stoffwechselfmessungen;
- vorgeschlagene Stoffwechselwege;
- Diskussion der Ergebnisse;
- Bewertung der Ergebnisse.

3.2. **Interpretation**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

4. **LITERATURHINWEISE**

Siehe allgemeine Einleitung Teil B.

---

## B.37 VERZÖGERTE NEUROTOXIZITÄT PHOSPHORORGANISCHER SUBSTANZEN NACH AKUTER EXPOSITION

### 1. METHODE

#### 1.1. Einleitung

Bei der Abschätzung und Bewertung der toxischen Wirkungen von Substanzen muß auch das Potential bestimmter Substanzklassen für spezifische neurotoxische Wirkungen, die in anderen Toxizitätsstudien möglicherweise nicht nachweisbar sind, untersucht werden. Bei einigen phosphororganischen Verbindungen wurden verzögerte neurotoxische Wirkungen beobachtet; diese Substanzen kommen für eine Untersuchung mit der vorliegenden Methode in Frage.

In-vitro-Screening-Tests könnten verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die eine verzögerte Polyneuropathie hervorrufen können; allerdings lassen negative Ergebnisse von In-vitro-Studien nicht darauf schließen, daß die Prüfsubstanz kein Neurotoxikum ist.

Siehe auch Allgemeine Einführung Teil B.

#### 1.2. Definitionen

Zu den phosphororganischen Substanzen zählen ungeladene phosphororganische Ester, Thiöster oder Anhydride von Phosphinsäuren, Phosphonsäuren bzw. Phosphoramidsäuren oder die engverwandten Thiophosphinsäuren, Thiophosphonsäuren bzw. Thiophosphoramidsäuren oder sonstige Substanzen, welche die bei dieser Substanzklasse bisweilen zu beobachtende verzögerte Neurotoxizität aufweisen können.

Verzögerte Neurotoxizität ist ein Syndrom, das mit langsamem, verzögertem Auftreten von Ataxien, distalen Axonopathien in Rückenmarks- und peripheren Nerven sowie einer Hemmung und Alterung der Neuropathy Target Esterase (NTE) im Nervengewebe verbunden ist.

#### 1.3. Referenzsubstanzen

Eine Referenzsubstanz kann mit einer positiven Kontrollgruppe getestet werden, um nachzuweisen, daß sich die Reaktion der geprüften Spezies unter den Laborversuchsbedingungen nicht wesentlich verändert hat.

Ein Beispiel für ein weitverbreitetes Neurotoxikum ist das Tri-*o*-tolylphosphat (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-Bezeichnung: Tris(2-methylphenyl)phosphorsäureester), das auch als Tris-*o*-cresylphosphat bezeichnet wird.

#### 1.4. Prinzip der Prüfmethode

Die Prüfsubstanz wird oral als Einmalgabe an Haushühner verabreicht, die ggf. gegen akute cholinergische Wirkungen geschützt wurden. Die Tiere werden für die Dauer von 21 Tagen auf Verhaltensauffälligkeiten, Ataxie und Paralysen hin beobachtet. Biochemische Parameter, insbesondere die Neuropathy Target Esterase (NTE), werden im allgemeinen 24 und 48 Stunden nach Verabreichung bei Hennen bestimmt, die nach Zufallskriterien aus jeder Gruppe ausgewählt werden. 21 Tage nach der Exposition werden die verbliebenen Hennen getötet, und ausgewählte Nervengewebe werden histopathologisch untersucht.

#### 1.5. Beschreibung der Prüfmethode

##### 1.5.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Hennen, die frei von störenden Viruserkrankungen und Arzneimitteln sind und keine Gangstörungen aufweisen, werden randomisiert, der Behandlungs- oder der Kontrollgruppe zugeteilt und für die Dauer von mindestens fünf Tagen vor Beginn der Studie an die Laborbedingungen akklimatisiert.

Die Käfige oder Gehege sollten so groß sein, daß sich die Tiere frei bewegen können und ihr Gangbild gut zu beobachten ist.

Die Gabe der Prüfsubstanz erfolgt normalerweise auf oralem Wege mittels Magensonde, Gelatinekapseln oder einer vergleichbaren Methode. Flüssigkeiten können unverdünnt oder aufgelöst in einem geeigneten Vehikel wie z. B. Maisöl verabreicht werden. Feste Substanzen sollten nach Möglichkeit aufgelöst werden, da grössere Dosen fester Stoffe in Gelatinekapseln möglicherweise nicht wirksam resorbiert werden. Bei nichtwäßrigen Vehikeln sollten deren toxische Eigenschaften bekannt sein. Ist dies nicht der Fall, müssen sie vor der Prüfung bestimmt

werden.

## 1.5.2. Prüfbedingungen

### 1.5.2.1. Versuchstiere

Junge erwachsene Legehennen (*Gallus gallus domesticus*) im Alter von 8 bis 12 Monaten werden für den Test empfohlen. Normalgrosse Rassen sollten verwendet werden, und die Hennen sollten in der Regel unter Bedingungen aufgewachsen sein, unter denen sie sich frei bewegen konnten.

### 1.5.2.2. Anzahl und Geschlecht

Neben der Behandlungsgruppe sollte eine Vehikelkontrollgruppe und eine positive Kontrollgruppe getestet werden. Die Vehikelkontrollgruppe ist, abgesehen von der Verabreichung der Prüfsubstanz, genauso zu behandeln wie die Behandlungsgruppe. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sollte so bemessen sein, daß mindestens sechs Tiere zur Bestimmung biochemischer Parameter (jeweils drei Tiere zu zwei Beobachtungszeitpunkten) getötet werden können und sechs Tiere für die pathologische Untersuchung bis zum 21. Tag überleben.

Die positive Kontrollgruppe kann gleichzeitig getestet werden oder es kann sich um eine bereits zuvor untersuchte Kontrollgruppe handeln. Die Gruppe sollte aus mindestens sechs Hennen bestehen, die mit einem bekannten verzögerten Neurotoikum behandelt wurden. Drei der Tiere sind für biochemische, drei für pathologische Untersuchungen nach Ende des Tests vorgesehen. Es empfiehlt sich eine regelmässige Aktualisierung der Archivdaten. Neue positive Kontrolldaten sollten erarbeitet werden, wenn ein wesentlicher Aspekt des Testablaufs (z. B. Rasse, Futter, Haltungsbedingungen) vom durchführenden Labor geändert wurde.

### 1.5.2.3. Dosierungen

In einer Vorstudie an einer geeigneten Zahl von Tieren und Dosisgruppen ist die in der Hauptstudie zu verwendende Dosis zu ermitteln. Hierbei sind in der Regel einige Todesfälle erforderlich, um eine angemessene Dosis für die Hauptstudie festlegen zu können. Um aber Todesfälle durch akute cholinerge Wirkungen zu vermeiden, kann Atropin oder ein anderer schützender Wirkstoff, von dem man weiß, daß er keinen Einfluß auf verzögerte neurotoxische Wirkungen hat, verabreicht werden. Zur Abschätzung der maximalen nicht letalen Dosis der Prüfsubstanz stehen eine Reihe verschiedener Methoden zur Auswahl (siehe Methode B.1bis). Bereits vorliegende frühere Daten für Hennen oder andere toxikologische Daten können ebenfalls bei der Wahl der Dosis von Bedeutung sein.

Die Dosis der Prüfsubstanz in der Hauptstudie sollte unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Vorstudie zur Dosisfindung sowie der oberen Grenzdosis von 2 000 mg/kg Körpergewicht möglichst hoch sein. Auch wenn Todesfälle auftreten, sollten bis zum 21. Tag genügend Tiere für die biochemischen (sechs) und die histologischen Untersuchungen (sechs) überleben. Um Todesfälle infolge akuter cholinergischer Wirkungen auszuschließen, sollte Atropin oder ein anderer schützender Wirkstoff, der nachgewiesenermassen keinen Einfluß auf verzögerte neurotoxische Wirkungen hat, gegeben werden.

### 1.5.2.4. Limit-Test

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen, und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine Studie mit einer höheren Dosis gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test findet allerdings keine Anwendung, wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung in einer höheren Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.5.2.5. Beobachtungszeitraum

Der Beobachtungszeitraum sollte 21 Tage betragen.

## 1.5.3. Versuchsdurchführung

Nach Verabreichung eines schützenden Wirkstoffs zur Verhinderung von Todesfällen durch akute cholinergische Wirkungen wird die Prüfsubstanz als Einmalgabe verabreicht.

#### 1.5.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Die Beobachtungen sollten unmittelbar nach der Exposition beginnen. Alle Hennen sind in den ersten beiden Tagen mehrmals am Tag und danach bis zum 21. Tag oder bis zur vorgesehenen Tötung mindestens einmal täglich zu beobachten. Alle Toxizitätszeichen, einschließlich Zeitpunkt des Beginns, Art, Schweregrad und Dauer von Verhaltensauffälligkeiten, sind zu dokumentieren. Die Ataxie wird auf einer Ordinalskala aus mindestens vier Stufen bewertet, und Paralysen werden dokumentiert. Mindestens zweimal wöchentlich sollten die für die pathologische Untersuchung vorgesehenen Hennen aus dem Käfig genommen und für einen bestimmten Zeitraum zu verstärkter motorischer Aktivität, z. B. durch Begehen einer Leiter, gezwungen werden, um die Beobachtung bereits geringster toxischer Wirkungen zu erleichtern. Moribunde Tiere und Tiere, bei denen schweres Leiden oder starke Schmerzen festgestellt werden, sollten ausgesondert, unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und seziiert werden.

#### 1.5.3.2. Körpergewicht

Alle Hennen müssen unmittelbar vor der Verabreichung der Prüfsubstanz und danach mindestens einmal wöchentlich gewogen werden.

#### 1.5.3.3. Biochemische Untersuchungen

Je sechs Hennen, die nach Zufallskriterien aus der Behandlungs- und der Vehikelkontrollgruppe ausgewählt werden, sowie drei Hennen aus der positiven Kontrollgruppe (wenn diese Gruppe gleichzeitig getestet wird), sollten einige Tage nach der Gabe der Prüfsubstanz getötet werden, um Gehirn und lumbales Rückenmark zu präparieren und auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase zu untersuchen. Auch die Präparation und Untersuchung des Ischiasnervengewebes auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase kann aufschlußreich sein. In der Regel werden drei Tiere der Negativkontrolle sowie jeder Behandlungsgruppe nach 24 Stunden und drei nach 48 Stunden getötet, während die drei Hennen der Positivkontrolle nach 24 Stunden getötet werden sollten. Zeigt die Beobachtung der klinischen Zeichen der Intoxikation (z. B. durch Beobachtung des zeitlichen Beginns der cholinergen Zeichen), daß der toxische Wirkstoff möglicherweise ausgesprochen langsam eliminiert wird, empfiehlt es sich gegebenenfalls, von je drei Tieren zu jeweils zwei Zeitpunkten innerhalb von 24 bis spätestens 72 Stunden nach der Verabreichung der Prüfsubstanz Gewebeproben zu entnehmen.

An diesen Proben können auch Bestimmungen der Acetylcholinesterase (AChE) vorgenommen werden, wenn dies angezeigt erscheint. Allerdings kann es in vivo zur spontanen Reaktivierung von AChE kommen, so daß die Wirksamkeit der Prüfsubstanz als AChE-Hemmer unterschätzt wird.

#### 1.5.3.4. Autopsie

Alle Versuchstiere (sowohl die nach Plan getöteten als auch die aufgrund ihres moribunden Zustands getöteten) werden einer Autopsie zur Untersuchung von Gehirn und Rückenmark unterzogen.

#### 1.5.3.5. Histopathologische Untersuchung

Nervengewebe von Tieren, die die Beobachtungsdauer überleben und nicht für biochemische Untersuchungen vorgesehen sind, wird mikroskopisch untersucht. Die Gewebe werden in situ mittels Perfusionsverfahren fixiert. Gewebeschnitte werden unter anderem von Cerebellum (mittlere Längsebene), Medulla oblongata, Rückenmark und peripheren Nerven angefertigt. Die Rückenmarkschnitte sind vom oberen Halswirbelsegment, der mittleren thorakalen und der lumbosakralen Region zu entnehmen. Auch vom distalen Bereich des Nervus tibialis und seiner Verzweigungen zum Musculus gastrocnemius sowie vom Nervus sciaticus sollten Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte werden mit geeigneten myelin- und axonspezifischen Färbemitteln angefärbt.

## 2. DATEN

Negative Ergebnisse für die in dieser Methode gewählten Endpunkte (Biochemie,

Histopathologie und Verhaltensbeobachtung) erfordern normalerweise keine weiteren Untersuchungen auf eine verzögerte Neurotoxizität. Zweifelhafte oder unklare Ergebnisse für diese Endpunkte erfordern ggf. weitere Untersuchungen.

Die Daten für die einzelnen Tiere sollten aufgeführt werden. Ferner sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der verwendeten Tiere bei Beginn der Prüfung, die Anzahl der Tiere mit Läsionen, verhaltensbezogenen oder biochemischen Wirkungen, die Arten und Schweregrade dieser Läsionen bzw. Wirkungen sowie der Anteil der von den verschiedenen Arten und Schweregraden der Läsionen bzw. Wirkungen betroffenen Tiere.

Die Ergebnisse dieser Studie sind im Hinblick auf Häufigkeit, Schweregrad und Korrelation der verhaltensbezogenen, biochemischen und histopathologischen Wirkungen sowie sonstiger verzeichneter Wirkungen in den Behandlungs- und Kontrollgruppen zu bewerten.

Die numerischen Daten sind nach Möglichkeit durch geeignete und allgemein akzeptierte statistische Verfahren auszuwerten. Diese statistischen Verfahren sollten bei der Festlegung des Designs der Studie ausgewählt werden.

### 3. ABSCHLUSSBERICHT

#### Prüfbericht

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

#### Versuchstiere:

- verwendete Rasse;
- Anzahl und Alter;
- Herkunft, Haltungsbedingungen usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn.

#### Prüfbedingungen:

- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz, zur Stabilität und ggf. zur Homogenität;
- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- Begründung für die Wahl der Dosis;
- Angabe der verabreichten Dosen mit Angaben zu Vehikel, Volumen und physikalischer Form des verabreichten Stoffes;
- Identität und Angaben zur Verabreichung eventueller schützender Wirkstoffe.

#### Ergebnisse:

- Angaben zum Körpergewicht;
- Daten der toxischen Reaktionen nach Gruppen, einschließlich Todesfälle;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- ausführliche Beschreibung der biochemischen Methoden und Befunde;
- Sektionsbefunde;
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- ggf. statistische Auswertung der Ergebnisse.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

### 4. LITERATUR

Diese Methode entspricht der ÖCD TG 418.



## B.38 VERZÖGERTE NEUROTOXIZITÄT PHOSPHORORGANISCHER SUBSTANZEN BEI WIEDERHOLTER GABE ÜBER 28 TAGE

### 1. METHODE

#### 1.1. Einleitung

Bei der Abschätzung und Bewertung der toxischen Wirkungen von Substanzen muß auch das Potential bestimmter Substanzklassen für spezifische neurotoxische Wirkungen, die in anderen Toxizitätsstudien möglicherweise nicht nachweisbar sind, untersucht werden. Bei einigen phosphororganischen Verbindungen wurden verzögerte neurotoxische Wirkungen beobachtet; diese Substanzen kommen für eine Untersuchung mit der vorliegenden Methode in Frage.

In-vitro-Screening-Tests könnten verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren, die eine verzögerte Polyneuropathie hervorrufen können; allerdings lassen negative Ergebnisse von In-vitro-Studien nicht darauf schließen, daß die Prüfsubstanz kein Neurotoxikum ist.

Diese Prüfung auf verzögerte Neurotoxizität nach 28tägiger Gabe gibt Aufschluß über mögliche Gesundheitsgefahren infolge wiederholter Exposition über einen begrenzten Zeitraum. Die Prüfung erlaubt Rückschlüsse auf die Dosis-Wirkungs-Beziehung und ermöglicht die Abschätzung einer Schwellendosis, unterhalb der keine toxische Wirkung mehr feststellbar ist (NOÄL). Mit Hilfe des NOÄL lassen sich Sicherheitskriterien für die Exposition beim Menschen festlegen.

Siehe auch Allgemeine Einführung Teil B.

#### 1.2. Definitionen

Zu den phosphororganischen Substanzen zählen ungeladene phosphororganische Ester, Thiöster oder Anhydride von Phosphinsäuren, Phosphonsäuren bzw. Phosphoramidsäuren oder die engverwandten Thiophosphinsäuren, Thiophosphonsäuren bzw. Thiophosphoramidsäuren oder sonstige Substanzen, welche die bei dieser Substanzklasse bisweilen zu beobachtende verzögerte Neurotoxizität hervorrufen können.

Verzögerte Neurotoxizität ist ein Syndrom, das mit langsamem, verzögertem Auftreten von Ataxien, distalen Axonopathien in Rückenmarks- und peripheren Nerven sowie einer Hemmung und Alterung der Neuropathy Target Esterase (NTE) im Nervengewebe verbunden ist.

#### 1.3. Prinzip der Prüfmethode

Die Prüfsubstanz wird 28 Tage lang einmal täglich oral an Haushühner verabreicht. Die Tiere werden bis 14 Tage nach der letzten Gabe mindestens einmal täglich auf auffälliges Verhalten, Ataxie und Paralysen hin beobachtet. Biochemische Parameter, insbesondere die Neuropathy Target Esterase (NTE), werden im allgemeinen 24 und 48 Stunden nach Verabreichung der letzten Dosis bei Hennen bestimmt, die nach Zufallskriterien aus jeder Gruppe ausgewählt werden. Zwei Wochen nach der letzten Gabe werden die verbliebenen Hennen getötet, und ausgewählte Nervengewebe werden histopathologisch untersucht.

#### 1.4. Beschreibung der Prüfmethode

##### 1.4.1. Vorbereitungen

Gesunde junge erwachsene Hennen, die frei von störenden Viruserkrankungen und Arzneimitteln sind und keine Gangstörungen aufweisen, werden randomisiert, der Behandlungs- oder der Kontrollgruppe zugeteilt und für die Dauer von mindestens fünf Tagen vor Beginn der Studie an die Laborbedingungen akklimatisiert.

Die Käfige oder Gehege sollten so groß sein, daß sich die Tiere frei bewegen können und ihr Gangbild gut zu beobachten ist.

Die orale Gabe der Prüfsubstanz an 7 Tagen in der Woche sollte vorzugsweise mittels Magensonde oder Verabreichung von Gelatinekapseln erfolgen. Flüssigkeiten können unverdünnt oder aufgelöst in einem geeigneten Vehikel wie z. B. Maisöl verabreicht werden. Feste Substanzen sollten nach Möglichkeit aufgelöst werden, da grössere Dosen fester Stoffe in Gelatinekapseln möglicherweise nicht wirksam resorbiert werden. Bei nichtwäßrigen Vehikeln sollten deren toxische Eigenschaften bekannt sein. Ist dies nicht der Fall, müssen sie vor der Prüfung bestimmt werden.

## 1.4.2. Prüfbedingungen

### 1.4.2.1. Versuchstiere

Junge erwachsene Legehennen (*Gallus gallus domesticus*) im Alter von 8 bis 12 Monaten werden für den Test empfohlen. Normalgrosse Rassen sollten verwendet werden, und die Hennen sollten normalerweise unter Bedingungen aufgewachsen sein, unter denen sie sich frei bewegen konnten.

### 1.4.2.2. Anzahl und Geschlecht

In der Regel sollten mindestens drei Behandlungsgruppen sowie eine Vehikelkontrollgruppe getestet werden. Die Vehikelkontrollgruppe ist, abgesehen von der Verabreichung der Prüfsubstanz, genauso zu behandeln wie die Behandlungsgruppen.

Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sollte so bemessen sein, daß mindestens sechs zur Bestimmung biochemischer Parameter (jeweils drei Tiere zu zwei Beobachtungszeitpunkten) getötet werden können und mindestens sechs Tiere für die pathologische Untersuchung bis 14 Tage nach der letzten Gabe überleben.

### 1.4.2.3. Dosierungen

Bei der Wahl der Dosisstufen sind die Ergebnisse einer Akutprüfung auf verzögerte Neurotoxizität sowie weitere vorliegende Daten zur Toxizität oder Kinetik der Prüfsubstanz berücksichtigt worden. Die höchste Dosis sollte so gewählt werden, daß zwar toxische Wirkungen, vorzugsweise eine verzögerte Neurotoxizität, aber keine Todesfälle oder schweres Leiden hervorgerufen werden. Anschließend sollte eine absteigende Folge von Dosisstufen gewählt werden, um dosisabhängige Wirkungen und die niedrigste Dosis ohne zu beobachtende unerwünschte Wirkungen nachzuweisen.

### 1.4.2.4. Limit-Test

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 1 000 mg/kg Körpergewicht pro Tag unter Verwendung der für diese Studie beschriebenen Verfahren keine feststellbaren toxischen Wirkungen, und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Toxizität zu erwarten, kann auf eine Studie mit einer höheren Dosis gegebenenfalls verzichtet werden. Der Limit-Test findet allerdings keine Anwendung, wenn die Expositionswirkungen beim Menschen die Prüfung in einer höheren Dosis angezeigt erscheinen lassen.

### 1.4.2.5. Beobachtungszeitraum

Alle Tiere werden während der Expositionsdauer und bis 14 Tage danach mindestens täglich beobachtet, sofern sie nicht für die Sektion vorgesehen sind.

## 1.4.3. Versuchsdurchführung

Die Tiere erhalten die Prüfsubstanz für die Dauer von 28 Tagen an sieben Tagen in der Woche.

### 1.4.3.1. Allgemeine Beobachtungen

Die Beobachtungen sollten unmittelbar nach Behandlungsbeginn beginnen. Alle Hennen sind an jedem der 28 Behandlungstage und an den 14 Tagen nach der letzten Gabe oder bis zur vorgesehenen Tötung mindestens einmal täglich zu beobachten. Alle Toxizitätszeichen, einschließlich Zeitpunkt ihres Beginns sowie Art, Schweregrad und Dauer sind zu dokumentieren. Die Beobachtungen sollten auch, jedoch nicht nur, Verhaltensauffälligkeiten einschließen. Die Ataxie wird auf einer Ordinalskala aus mindestens vier Stufen bewertet, und Paralysen werden ebenfalls dokumentiert. Mindestens zweimal wöchentlich sollten die Hennen aus dem Käfig genommen und für einen bestimmten Zeitraum zu verstärkter motorischer Aktivität, z. B. durch Begehen einer Leiter, gezwungen werden, um die Beobachtung bereits geringster toxischer Wirkungen zu erleichtern. Moribunde Tiere und Tiere, bei denen schweres Leiden oder starke Schmerzen festgestellt werden, sollten ausgesondert, unter Verwendung einer tierschutzgerechten Methode getötet und sezirt werden.

### 1.4.3.2. Körpergewicht

Alle Hennen müssen unmittelbar vor der ersten Gabe der Prüfsubstanz und danach mindestens einmal wöchentlich gewogen werden.

### 1.4.3.3. Biochemische Untersuchungen

Je sechs Hennen, die nach Zufallskriterien aus der Behandlungs- und der Vehikelkontrollgruppe ausgewählt werden, sollten einige Tage nach der letzten Gabe der Prüfsubstanz getötet werden, um Gehirn und lumbales Rückenmark zu präparieren und auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase (NTE) zu untersuchen. Auch die Präparation und Untersuchung des Ischiasnervengewebes auf hemmende Aktivität gegen Neuropathy Target Esterase kann aufschlußreich sein. In der Regel werden drei Tiere der Kontrollgruppe sowie jeder Behandlungsgruppe nach 24 Stunden und drei 48 Stunden nach der letzten Dosis getötet. Sind aufgrund der Daten aus der Akutstudie oder aus anderen Untersuchungen (z. B. zur Toxikokinetik) andere Tötungszeiten nach der letzten Gabe der Prüfsubstanz angezeigt, sollte entsprechend vorgegangen und das geänderte Vorgehen begründet werden.

An diesen Proben können auch Bestimmungen der Acetylcholinesterase (AChE) vorgenommen werden, wenn dies angezeigt erscheint. Allerdings kann es in vivo zur spontanen Reaktivierung von AChE kommen, so daß die Wirksamkeit der Prüfsubstanz als AChE-Hemmer unterschätzt wird.

#### 1.4.3.4. Autopsie

Alle Versuchstiere (sowohl die nach Plan getöteten als auch die aufgrund ihres moribunden Zustands getöteten) werden einer Autopsie zur Untersuchung von Gehirn und Rückenmark unterzogen.

#### 1.4.3.5. Histopathologische Untersuchung

Nervengewebe von Tieren, die die Beobachtungsdauer überleben und nicht für biochemische Untersuchungen vorgesehen sind, wird mikroskopisch untersucht. Die Gewebe werden in situ mittels Perfusionsverfahren fixiert. Gewebeschnitte werden unter anderem von Cerebellum (mittlere Längsebene), Medulla oblongata, Rückenmark und peripheren Nerven angefertigt. Die Rückenmarkschnitte sind vom oberen Halswirbelsegment, der mittleren thorakalen und der lumbosakralen Region zu entnehmen. Auch vom distalen Bereich des Nervus tibialis und seiner Verzweigungen zum Musculus gastrocnemius sowie vom Nervus sciaticus sollten Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte werden mit geeigneten myelin- und axonspezifischen Färbemitteln angefärbt. Die mikroskopischen Untersuchungen sind zunächst an den konservierten Geweben aller Tiere in der Kontrollgruppe sowie der höchsten Dosisgruppe vorzunehmen. Ergeben sich Anhaltspunkte für Wirkungen in der höchsten Dosisgruppe, sollte die mikroskopische Untersuchung auch bei den Hennen aus der mittleren und niedrigen Dosisgruppe erfolgen.

## 2. DATEN

Negative Ergebnisse für die in dieser Methode gewählten Endpunkte (Biochemie, Histopathologie und Verhaltensbeobachtung) erfordern normalerweise keine weiteren Untersuchungen auf eine verzögerte Neurotoxizität. Zweifelhafte oder unklare Ergebnisse für diese Endpunkte erfordern ggf. weitere Untersuchungen.

Die Daten für die einzelnen Tiere sollten aufgeführt werden. Ferner sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefasst werden. Daraus müssen für jede Prüfgruppe folgende Angaben hervorgehen: die Anzahl der verwendeten Tiere bei Beginn der Prüfung, die Anzahl der Tiere mit Läsionen, verhaltensbezogenen oder biochemischen Wirkungen, die Arten und Schweregrade dieser Läsionen bzw. Wirkungen sowie der Anteil der von den verschiedenen Arten und Schweregraden der Läsionen bzw. Wirkungen betroffenen Tiere.

Die Ergebnisse dieser Studie sind im Hinblick auf Häufigkeit, Schweregrad und Korrelation der verhaltensbezogenen, biochemischen und histopathologischen Wirkungen sowie sonstiger verzeichneter Wirkungen in den Behandlungs- und Kontrollgruppen zu bewerten.

Die numerischen Daten sind nach Möglichkeit durch geeignete und allgemein akzeptierte statistische Verfahren auszuwerten. Diese statistischen Verfahren sollten bei der Festlegung des Designs der Studie ausgewählt werden.

## 3. ABSCHLUSSBERICHT

Prüfbericht

Der Prüfbericht soll nach Möglichkeit folgende Angaben enthalten:

Versuchstiere:

- verwendete Rasse;
- Anzahl und Alter der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn.

Prüfbedingungen:

- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz, zur Stabilität und zur Homogenität;
- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- Begründung für die Wahl der Dosis;
- Angabe der verabreichten Dosen mit Angaben zu Vehikel, Volumen und physikalischer Form des verabreichten Stoffes;
- Begründung für die Wahl anderer Zeitpunkte zur Bestimmung der biochemischen Parameter (falls nicht nach 24 und 48 Stunden).

Ergebnisse:

- Angaben zum Körpergewicht;
- Daten der toxischen Reaktionen nach Dosisstufen, einschließlich Todesfälle;
- NOÄL;
- Art, Schweregrad und Dauer der klinischen Beobachtungen (mit Angaben zur Reversibilität);
- ausführliche Beschreibung der biochemischen Methoden und Befunde;
- Sektionsbefunde;
- ausführliche Beschreibung aller histopathologischen Befunde;
- ggf. statistische Auswertung der Ergebnisse.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen.

#### 4. LITERATUR

Diese Methode entspricht der ÖCD TG 419

## B.39. *IN-VIVO*-TEST ZUR UNPLANMÄSSIGEN DNA-SYNTHESE (UDS) IN SÄUGETIERLEBERZELLEN

### 1. METHODE

Diese Methode entspricht der OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

#### 1.1 EINLEITUNG

Der *In-vivo*-Test zur unplanmäßigen DNA-Synthese in Säugetierleberzellen dient zum Nachweis von Agenzien, die in den Leberzellen der behandelten Tiere eine DNA-Reparatur auslösen (siehe 1,2,3,4).

Dieser *In-vivo*-Test ermöglicht die Untersuchung der gentoxischen Wirkung von Chemikalien in der Leber. Der ermittelte Endpunkt deutet auf eine DNA-Schädigung und anschließende Reparatur in Leberzellen hin. Die Leber ist in der Regel Hauptort des Stoffwechsels der resorbierten Verbindungen. Sie eignet sich also gut zur *In-vivo*-Bestimmung einer DNA-Schädigung.

Wenn Anzeichen dafür bestehen, daß die Prüfsubstanz das Zielgewebe nicht erreicht, ist dieser Test nicht geeignet.

Der Endpunkt der unplanmäßigen DNA-Synthese (UDS) wird durch die Bestimmung der Aufnahme markierter Nucleoside in Zellen, die keine planmäßige (S-Phasen-) DNA-Synthese durchlaufen, ermittelt. Das gängigste Verfahren ist die Bestimmung der Aufnahme von tritiummarkiertem Thymidin (<sup>3</sup>H-TdR) durch Autoradiographie. Für *In-vivo*-UDS-Tests wird vorzugsweise die Leber von Ratten verwendet. Neben Lebergewebe kann auch anderes Gewebe Verwendung finden, doch ist dieses nicht Gegenstand dieser Methode.

Der Nachweis einer UDS-Reaktion hängt von der Zahl der ausgeschnittenen und ersetzten DNA-Basen am Ort der Schädigung ab. Der UDS-Test eignet sich daher insbesondere zum Nachweis der von einer Substanz induzierten „Long-patch“-Reparatur (20-30 Basen). Die „Short-patch“-Reparatur (1-3 Basen) läßt sich hingegen nur mit einem wesentlich geringeren Empfindlichkeitsgrad feststellen. Zudem können mutagene Ereignisse aus der Nichtreparatur, fehlerhaften Reparatur oder fehlerhaften Replikation der DNA Läsionen herrühren. Das Ausmaß der UDS-Reaktion gibt keinen Aufschluß über die Genauigkeit des Reparaturprozesses. Darüber hinaus ist es möglich, daß ein Mutagen mit der DNA reagiert, die DNA-Schädigung aber nicht über einen Exzisionsreparaturprozeß behoben wird. Die Tatsache, daß der UDS-Test keine spezifischen Informationen zur mutagenen Aktivität liefert, wird durch die potentielle Empfindlichkeit dieses Endpunktes kompensiert, denn er wird im gesamten Genom ermittelt.

Siehe auch Allgemeine Einleitung Teil B.

#### 1.2 DEFINITIONEN

**In Reparatur befindliche Zellen:** Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG) oberhalb eines vorher festgelegten Schwellenwerts, der von dem jeweiligen Labor zu begründen ist.

**Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG):** quantitative Maßzahl der UDS-Aktivität von Zellen bei autoradiographischen UDS-Tests, errechnet durch Subtraktion der durchschnittlichen Körnerzahl über kernäquivalenten Bereichen des Zytoplasmas (CG) von der Körnerzahl über dem Zellkern (NG):  $NNG = NG - CG$ . Die NNG wird für einzelne Zellen bestimmt, dann für alle Zellen in einer Kultur, in Parallelkulturen usw.

**Unplanmäßige DNA-Synthese (UDS):** DNA-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen des Abschnitts eines DNA-Stranges, der eine Region mit einer durch chemische Substanzen oder physikalische Agenzien induzierten Schädigung enthält.

### 1.3 PRINZIP DER PRÜFMETHODE

Der In-vivo-UDS-Test an Säugetierleberzellen erbringt den Nachweis einer DNA-Reparatursynthese nach Ausschneiden und Entfernen eines DNA-Abschnittes, der eine Region mit einer durch chemische Substanzen oder physikalische Agenzien induzierten Schädigung enthält. Der Test beruht gewöhnlich auf dem Einbau von <sup>3</sup>H-TdR in die DNA von Leberzellen, wo sich nur wenige Zellen in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die Aufnahme von <sup>3</sup>H-TdR wird in der Regel durch Autoradiographie bestimmt, da dieses Verfahren nicht so anfällig für eine Einwirkung durch S-Phasen-Zellen ist wie beispielsweise die Flüssigkeitsszintillationszählung (LSC).

### 1.4 BESCHREIBUNG DER PRÜFMETHODE

#### 1.4.1 **Vorbereitungen**

##### 1.4.1.1 *Versuchstiere*

Gewöhnlich werden Ratten verwendet, doch kommen auch andere geeignete Säugetierarten in Frage. Es sollten junge gesunde und geschlechtsreife Tiere üblicher Labortierstämme zum Einsatz kommen. Zu Beginn der Versuchs sollte die Abweichung des Körpergewichts der Tiere vom Mittelwert so gering wie möglich sein und bei beiden Geschlechtern nicht mehr als  $\pm 20\%$  betragen.

##### 1.4.1.2 *Haltungs- und Fütterungsbedingungen*

Es gelten die allgemeinen Bedingungen in der Allgemeinen Einleitung zu Teil B, doch ist bei der Luftfeuchtigkeit ein Wert von 50-60 % anzustreben.

##### 1.4.1.3 *Vorbereitung der Tiere*

Gesunde und geschlechtsreife junge Tiere werden randomisiert und den einzelnen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeteilt. Die Käfige sind so anzuordnen, daß sich ihre Position möglichst wenig auswirkt. Es erfolgt eine Einzelidentifizierung der Tiere. Vor Beginn der Studie werden die Tiere in ihren Käfigen über einen Zeitraum von mindestens fünf Tagen unter Laborbedingungen eingewöhnt.

##### 1.4.1.4 *Prüfsubstanz/Vorbereitung*

Feste Prüfsubstanzen sollten vor der Verabreichung an die Tiere in geeigneten Lösungsmitteln oder Vehikeln gelöst oder suspendiert und ggf. verdünnt werden. Flüssige Prüfsubstanzen können direkt verabreicht oder zuvor verdünnt werden. Es sind frische Zubereitungen der Prüfsubstanz zu verwenden, wenn die Stabilitätsdaten gegen eine Lagerung sprechen.

#### 1.4.2 **Prüfbedingungen**

##### 1.4.2.1 *Lösungsmittel/Vehikel*

Das Lösungsmittel/Vehikel sollte bei den gewählten Dosierungen keine toxischen Wirkungen hervorrufen und nicht im Verdacht stehen, mit der Prüfsubstanz eine chemische Reaktion einzugehen. Werden keine allgemein bekannten Lösungsmittel/Vehikel verwendet, so sind Referenzdaten zur Kompatibilität beizubringen. Es ist zu empfehlen, als erste Wahl möglichst die Verwendung eines wäßrigen Lösungsmittels/Vehikels in Erwägung zu ziehen.

#### 1.4.2.2 *Kontrollen*

Für jeden gesondert vorgenommenen Teil des Versuchs sind gleichzeitig Positiv- und Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen anzulegen. Bis auf die Verabreichung der Prüfsubstanz sind die Tiere der Kontrollgruppe ebenso zu behandeln wie die Tiere der Behandlungsgruppen.

Die als Positivkontrollen verwendeten Substanzen sollten erwiesenermaßen eine UDS bei Expositionskonzentrationen hervorrufen, die voraussichtlich eine erkennbare Zunahme gegenüber dem Hintergrund ergeben. Positivkontrollen, die eine Stoffwechselaktivierung benötigen, sollten in Dosen verwendet werden, die eine mäßige Reaktion hervorrufen (4). Die Dosen sollten so gewählt werden, daß die Wirkungen eindeutig sind, aber beim Auswerten nicht sofort die Identität der kodierten Objektträger erkennen lassen. Es kommen beispielsweise folgende Positivkontrollsubstanzen in Frage:

<b>Zeitpunkt der Probenahme</b>	<b>Substanz</b>	<b>CAS-Nr.</b>	<b>EINECS-Nr.</b>
Früh (2-4 Std.)	N-Nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Spät (12-16 Std.)	N-2-Fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Auch andere geeignete Positivkontrollsubstanzen kommen in Betracht. Es ist vertretbar, daß die Positivkontrolle auf anderem Wege als die Prüfsubstanz verabreicht wird.

#### 1.5 VERFAHREN

##### 1.5.1 **Anzahl und Geschlecht der Tiere**

Es ist eine ausreichende Anzahl von Tieren zu verwenden, um die natürliche biologische Schwankungsbreite der Testreaktion zu berücksichtigen. Jede Gruppe sollte mindestens 3 analysierbare Tiere umfassen. Liegt ein größerer Bestand an historischen Daten vor, so sind für die gleichzeitigen Negativ- und Positivkontrollgruppen nur 1 oder 2 Tiere erforderlich.

Wenn zum Zeitpunkt der Studie Daten aus Untersuchungen zur gleichen Spezies und Expositionsform vorliegen, die belegen, daß zwischen den Geschlechtern kein nennenswerter Unterschied der Toxizität feststellbar ist, reicht die Prüfung von Tieren nur eines - vorzugsweise des männlichen - Geschlechts aus. Sollte es sich beim Menschen um eine geschlechtsspezifische Exposition handeln, z.B. bei bestimmten pharmazeutischen Wirkstoffen, ist der Versuch an Tieren des betreffenden Geschlechts durchzuführen.

##### 1.5.2 **Behandlungsplan**

Die Prüfsubstanzen werden in der Regel als Einmalgabe verabreicht.

##### 1.5.3 **Dosierungen**

Im Normalfall sind mindestens zwei Dosisstufen zu verwenden. Unter der Höchstdosis ist jene Dosis zu verstehen, die so deutliche Toxizitätszeichen hervorruft, daß höhere Dosisstufen bei gleichem Verabreichungsschema voraussichtlich zum Tode führen. Die geringere Dosis sollte in der Regel 50% bis 25% der hohen Dosis entsprechen.

Substanzen mit spezifischen biologischen Aktivitäten bei geringen nichttoxischen Dosen (wie Hormone und Mitogene) entsprechen möglicherweise nicht den Dosierungskriterien und sollten anhand einer Einzelfallprüfung bewertet werden. Wird eine Studie zur Dosisfindung durchgeführt, weil keine geeigneten Daten verfügbar sind, so sollte sie im gleichen Labor unter Verwendung der gleichen Spezies, des gleichen Stammes und Geschlechts und der gleichen Behandlungsform wie im Hauptversuch erfolgen

Die Höchstdosis kann auch als jene Dosis definiert werden, die bestimmte Anzeichen von Toxizität in der Leber hervorruft (z.B. pyknotische Kerne).

#### 1.5.4 **Limit-Test**

Verursacht die Prüfung einer Dosis von mindestens 2000 mg/kg Körpergewicht bei Einmalgabe oder Gabe von zwei Teilmengen am gleichen Tag keine feststellbaren toxischen Wirkungen und ist aufgrund der Daten strukturverwandter Substanzen keine Genotoxizität zu erwarten, kann auf eine vollständige Studie verzichtet werden. Die voraussichtlichen Expositionswirkungen beim Menschen können aber beim Limit-Test eine höhere Dosis angezeigt erscheinen lassen.

#### 1.5.5 **Verabreichung**

Die Prüfsubstanz wird in der Regel mittels Magen- oder Schlundsonde verabreicht. Auch andere Expositionsformen können bei entsprechender Begründung vertretbar sein. Eine intraperitoneale Injektion ist allerdings nicht zu empfehlen, da die Leber damit möglicherweise der Prüfsubstanz direkt und nicht über das Kreislaufsystem ausgesetzt wird. Das maximale Flüssigkeitsvolumen, das jeweils durch Sonde oder Injektion verabreicht werden kann, hängt von der Größe des Versuchstieres ab. Das Volumen sollte 2 ml/100 g Körpergewicht nicht übersteigen. Die Verwendung eines höheren Volumens ist zu begründen. Abgesehen von Reizstoffen oder ätzenden Stoffen, die in der Regel bei höheren Konzentrationen eine verstärkte Wirkung hervorrufen, ist die Variabilität des Prüfvolumens dadurch auf ein Mindestmaß zu reduzieren, daß eine Konzentration gewählt wird, die auf allen Dosisstufen ein konstantes Volumen gewährleistet.

#### 1.5.6 **Präparation der Leberzellen**

Die Präparation der Leberzellen behandelte Tiere erfolgt in der Regel 12-16 Stunden nach der Verabreichung. Im allgemeinen ist zusätzlich eine frühere Aufarbeitung (gewöhnlich 2-4 Stunden nach der Behandlung) erforderlich, wenn nicht nach 12-16 Stunden eine eindeutige positive Reaktion vorliegt. Auf der Grundlage der toxikokinetischen Daten sind aber bei entsprechender Begründung auch Aufarbeitungen zu anderen Zeitpunkten möglich.

Kurzzeitkulturen von Säugetier-Leberzellen werden in der Regel dadurch angelegt, daß eine Perfusion der Leber *in situ* mit Collagenase erfolgt und es frisch gewonnenen Leberzellen ermöglicht wird, sich an eine geeignete Wachstumsfläche festzuheften. Die Leberzellen von Tieren der Negativkontrollgruppe sollten eine Lebensfähigkeit (5) von mindestens 50 % aufweisen.

#### 1.5.7 **Bestimmung der UDS**

Frisch isolierte Säugetier-Leberzellen werden über einen angemessenen Zeitraum, z.B. 3-8 Stunden, in einem <sup>3</sup>H-TdR enthaltenden Medium inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit sollte das Medium aus den Zellen entfernt werden, die dann mit einem überschüssiges unmarkiertes Thymidin enthaltenden Medium inkubiert werden können, um die nicht inkorporierte Radioaktivität zu verringern („cold chase“). Anschließend werden die Zellen gewaschen, fixiert und getrocknet. Bei längeren Inkubationszeiten ist eine „cold chase“ möglicherweise nicht erforderlich. Die Objektträger werden in Autoradiographieemulsion getaucht, im Dunkeln „belichtet“ (z.B. gekühlt für 7-14 Tage), entwickelt und gefärbt, und es werden die belichteten Silberkörner gezählt. Von jedem Tier werden zwei bis drei Objektträger hergestellt.



## 1.5.8 Analyse

Die Objektträgerpräparate sollten eine ausreichende Anzahl von morphologisch normalen Zellen enthalten, um eine aussagefähige Bewertung der UDS zu ermöglichen. Die Präparate werden mikroskopisch auf Zeichen offener Zytotoxizität (z.B. Pyknose, verringerte Werte der radioaktiven Markierung) untersucht. Vor der Bestimmung der Körnerzahl sind die Objektträger zu kodieren. In der Regel werden je Tier 100 Zellen von mindestens zwei Objektträgern ausgewertet. Die Auswertung von weniger als 100 Zellen/Tier ist zu begründen. Bei der Körnerzahlbestimmung erfolgt keine Zählung der S-Phasen-Kerne, doch kann der Anteil der S-Phasen-Zellen erfaßt werden.

Das Ausmaß des  $^3\text{H}$ -TdR-Einbaus im Zellkern und Zytoplasma morphologisch normaler Zellen, das an der Ablagerung von Silberkörnern ablesbar ist, sollte durch geeignete Verfahren ermittelt werden.

Die Körnerzahl wird über dem Zellkern (NG) und über kernäquivalenten Bereichen des Zytoplasmas (CG) ermittelt. Als CG-Wert kommt entweder die für den am stärksten markierten Bereich des Zytoplasmas ermittelte Körnerzahl oder der Durchschnittswert von zwei bis drei nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Bereichen in Nähe des Zellkerns in Frage. Auch andere Zählverfahren (z.B. Ganzzellenzählung) können bei entsprechender Begründung angewendet werden (6).

## 2. DATEN

### 2.1 AUFBEREITUNG DER ERGEBNISSE

Es sind die Daten für die einzelnen Objektträger und Tiere zu dokumentieren. Zusätzlich sollten alle Daten in tabellarischer Form zusammengefaßt werden. Die Nettokörnerzahl über dem Zellkern (NNG) ist für jede Zelle, für jedes Tier und für jede Dosis und jeden Zeitpunkt zu bestimmen, indem der CG-Wert vom NG-Wert subtrahiert wird. Werden die „in Reparatur befindlichen Zellen“ gezählt, so sollten die Kriterien für die Definition der „in Reparatur befindlichen Zellen“ begründet werden und auf historischen oder gleichzeitigen Negativkontrolldaten beruhen. Numerische Ergebnisse können mit Hilfe statistischer Verfahren bewertet werden. Kommen statistische Tests zur Anwendung, so sind sie vor Durchführung der Studie auszuwählen und zu begründen.

### 2.2 BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Als Beispiele für Kriterien zur Bestimmung positiver/negativer Reaktionen seien genannt:

- |         |      |  |
|---------|------|--|
| positiv | (i)  | NNG-Werte oberhalb eines vorher festgelegten Schwellenwerts, der auf der Grundlage von historischen Daten des Labors zu begründen ist; |
|         | (ii) | NNG -Werte, die deutlich über den Werten der gleichzeitigen Kontrolle liegen;  |
| negativ | (i)  | NNG-Werte, die unterhalb des historisch begründeten Schwellenwerts liegen;   |
|         | (ii) | NNG-Werte, die nicht wesentlich über den Werten der gleichzeitigen Kontrolle liegen.   |

Es ist die biologische Relevanz der Daten zu untersuchen, d.h. es sind Parameter wie Variabilität der Tiere, Dosis-Wirkungs-Verhältnis und Zytotoxizität zu berücksichtigen. Als Hilfsmittel bei der Bewertung der Versuchsergebnisse können statistische Methoden dienen. Die statistische Signifikanz sollte aber nicht der einzige bestimmende Faktor für eine positive Reaktion sein.

Auch wenn die meisten Versuche eindeutig positive oder negative Ergebnisse liefern, erlaubt der Datensatz in seltenen Fällen keine definitive Aussage über die Aktivität der Prüfsubstanz. Es kommt vor, daß sich die Ergebnisse unabhängig davon, wie oft der Versuch wiederholt wird, weiterhin als nicht eindeutig oder als fragwürdig erweisen.

Ein positiver Befund des In-vivo-UDS-Tests an Säugetierleberzellen deutet darauf hin, daß die Prüfsubstanz *in vivo* bei Säugetierleberzellen eine DNA-Schädigung hervorruft, die *in vitro* durch unplanmäßige DNA-Synthese repariert werden kann. Ein negativer Befund ist ein Anzeichen dafür, daß die Prüfsubstanz unter diesen Versuchsbedingungen keine mit diesem Test nachweisbare DNA-Schädigung induziert.

Zu erörtern ist die Wahrscheinlichkeit, daß die Prüfsubstanz in den allgemeinen Blutkreislauf bzw. in das spezifische Zielgewebe gelangt (z.B. systemische Toxizität).

### 3. **ABSCHLUSSBERICHT**

#### PRÜFBERICHT

Der Prüfbericht muß die folgenden Angaben enthalten:

##### Lösungsmittel/Vehikel

- Begründung für die Wahl des Vehikels;
- Löslichkeit und Stabilität der Prüfsubstanz im Lösungsmittel/Vehikel, falls bekannt;

##### Versuchstiere:

- Spezies/Stamm;
- Anzahl, Alter und Geschlecht der Tiere;
- Herkunft, Haltungsbedingungen, Futter usw.;
- Gewicht der einzelnen Tiere bei Prüfungsbeginn, einschließlich Bereich des Körpergewichts, Mittelwert und Standardabweichung für jede Gruppe;

##### Prüfbedingungen :

- Positiv- und Negativ-(Vehikel-/Lösungsmittel-)Kontrollen;
- Daten aus einer ggf. durchgeführten Dosisfindungsstudie;
- Begründung der gewählten Dosisstufen;
- Angaben zur Zubereitung der Prüfsubstanz;
- Angaben zur Verabreichung der Prüfsubstanz;
- Begründung für den Verabreichungsweg;
- ggf. Methoden zur Überprüfung, ob die Prüfsubstanz in den allgemeinen Kreislauf oder in das Zielgewebe gelangt;
- ggf. Angaben zur Umrechnung der Konzentration der Prüfsubstanz im Futter/Wasser (ppm) in die entsprechende Dosis (mg/kg Körpergewicht/Tag);
- Angaben über Futter- und Wasserqualität;
- nähere Angaben zum Behandlungs- und Stichprobenentnahmeplan;

- Methoden zur Bestimmung der Toxizität;
- Methoden zur Leberzellenpräparation und -kultur;
- verwendetes autoradiographisches Verfahren;
- Anzahl der präparierten Objektträger und der ausgewerteten Zellen;
- Bewertungskriterien;
- Kriterien zur Einstufung der Studien als positiv, negativ oder nicht eindeutig;

Ergebnisse:

- Mittelwerte der Körnerzahlen über dem Zellkern und über dem Zytoplasma sowie der Nettokörnerzahlen über dem Zellkern für jeden einzelnen Objektträger, jedes Tiere und jede Gruppe;
- nach Möglichkeit Dosis-Wirkungs-Verhältnis;
- ggf. statistische Auswertung;
- Toxizitätszeichen;
- Daten zu gleichzeitigen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen;
- Daten zu historischen Negativ-(Lösungsmittel-/Vehikel-)Kontrollen und Positivkontrollen mit **Bereichen** **Spannen**, Mittelwerten und Standardabweichungen;
- Anzahl der „in Reparatur befindlichen Zellen“, falls ermittelt;
- Anzahl der S-Phasen-Zellen, falls ermittelt;
- Lebensfähigkeit der Zellen.

Diskussion der Ergebnisse.

Schlußfolgerungen

#### 4. LITERATURHINWEISE

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. und Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, 1-18.
2. Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. und Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. *Mutation Res.* 189, 123-133.
3. 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. und Fox M., (Hrsg.) *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, 52-77.
4. Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. und Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, 263-285.
5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. und 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* DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, 21-27.
6. Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. und Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen.* 4, 553-562.

## B.40. PRÜFUNG AUF HAUTREIZENDE WIRKUNGEN

### 1. METHODE

#### 1.1 EINLEITUNG

Zwei *In-vitro*-Tests zur Prüfung auf hautätzende Wirkung - der TER-Test (TER = transcutaneous electrical resistance) an Rattenhaut und ein Test mit einem menschlichen Hautmodell - wurden vom Europäischen Zentrum zur Validierung von Alternativmethoden (ECVAM, Gemeinsame Forschungsstelle der Europäischen Kommission) (1)(2)(3) als wissenschaftlich validierte Tests anerkannt. Die Validierungsstudie des ECVAM hat gezeigt, dass beide Tests in der Lage sind, zuverlässig zwischen hautätzenden Stoffen und solchen, die diese Eigenschaften nicht aufweisen, zu unterscheiden. Darüber hinaus ermöglichte der Test auf der Grundlage eines Modells der menschlichen Haut eine korrekte Klassifizierung unterschiedlicher ätzender Wirkungsstärke (bekannte Stoffe, die zu schweren Verätzungen führen, R35, und sonstige hautätzende Stoffe, R34 (2)). Beide Testmethoden werden beschrieben; die Wahl des geeigneten Tests hängt von den spezifischen Anforderungen und Präferenzen der Anwender ab.

Siehe auch 'Allgemeine Einleitung' Teil B.

#### 1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNG

**Hautätzende Wirkung:** irreversible Schädigung des Hautgewebes nach Anwendung eines Testmaterials.

#### 1.3 REFERENZSTOFFE

Nicht spezifiziert, siehe jedoch Ziffern 1.5.3.4 und 1.7.2.3.

#### 1.4 PRINZIP DER TESTMETHODE – TER-TEST AN RATTENHAUT

Die Testsubstanz wird bis zu 24 Stunden topisch auf die Epidermis von Hautstücken aus dem Fell von Jungratten appliziert, die vorher tierschutzgerecht getötet wurden. Hautätzende Stoffe werden dabei durch ihre Fähigkeit, die Unversehrtheit der Hornhaut und ihrer Schutzfunktion zu zerstören, identifiziert, und zwar, indem die Verringerung des inhärenten transkutanen Hautwiderstands (TER) unter einen Schwellenwert ( $5k\Omega$ ) gemessen wird (4)(5). Reizende und nicht-reizende Stoffe bewirken keinen Rückgang des TER unter den Schwellenwert. Bei Testung von oberflächenaktiven Stoffen und neutralen organischen Stoffen (Begriffsbestimmung s. (6)) kann das Testverfahren durch einen Farbbindungsschritt ergänzt werden, um die Anzahl der speziell mit diesen Chemikaliertypen erzielten falsch positiven Ergebnisse zu reduzieren(2) (7).

#### 1.5 BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE – TER-TEST AN RATTENHAUT

##### 1.5.1 Versuchstiere

Für die Herstellung der Hautstücke sind Jungratten im Alter von 20-23 Tagen (Wistar oder vergleichbarer Stamm) erforderlich. Das Fell am Rücken und an den Flanken wird mit einem für Kleintiere geeigneten Instrument sorgfältig geschoren. Die Tiere werden dann mit vorsichtigen Wischbewegungen gewaschen, wobei diese Flächen in eine Antibiotikallösung getaucht werden (die Lösung enthält z. B. Streptomycin, Penicillin, Chloramphenicol und Amphotericin in Konzentrationen, die ein bakterielles Wachstum verhindern). Die Tiere werden dann am dritten oder vierten Tag nach dem ersten Waschvorgang erneut mit der Antibiotikallösung gewaschen und innerhalb von drei Tagen verwendet (die Tiere dürfen für die Hautpräparationen nicht älter als 31 Tage sein).

##### 1.5.2 Herstellung der Hautstücke

Die Versuchstiere werden tierschutzgerecht getötet. Sodann wird die Rückenhaut jedes Tieres entfernt, und von übermäßigem Fett befreit, das von der Haut sorgfältig abgeschält wird. Die Haut wird so über das Ende eines PTFE (Polytetrafluorethylen)-Rohres gelegt, dass die Epidermisoberfläche auf dem Ende des Rohres aufliegt. Zur Fixierung des Hautstücks wird ein 'O'-Ring aus Gummi straff über das Rohrende gezogen, und überflüssiges Hautgewebe wird abgeschnitten. Die Abmessungen des Rohrs und des 'O'-Rings sind in Abb. 1 angegeben. Der 'O'-Ring wird sodann mit gereinigter Naturvaseline zum Ende des PTFE-Rohrs hin gründlich abgedichtet. Das Rohr wird durch eine Federklemme in einer Rezeptorkammer gehalten, die Magnesiumsulfatlösung (154mM) enthält (Abb. 2).

### 1.5.3 Testverfahren

#### 1.5.3.1 Aufbringung der Testsubstanzen

Flüssige Testsubstanzen (150µl) werden auf die Epidermisoberfläche innerhalb des Rohrs gebracht (Abb. 2). Zur Testung von Feststoffen wird eine ausreichende Menge auf das Hautstück aufgebracht, wobei darauf zu achten ist, dass die gesamte Oberfläche der Epidermis bedeckt ist. Sodann wird entionisiertes Wasser (150µl) auf den Feststoff gebracht und das Rohr zur Verteilung des Feststoffes leicht bewegt. Die Testsubstanzen sollten mit der Haut optimal in Kontakt kommen. Bei einigen Feststoffen kann dies durch Erwärmung bis zu 30° C zwecks Schmelzen oder durch Zermahlen zu einem Granulat oder Pulver erreicht werden.

Für jede Testsubstanz werden drei Hautstücke verwendet. Die Testsubstanz wird 24 Stunden lang aufgebracht (s. auch 1.5.3.4), sodann durch Waschen unter fließendem Wasser bei maximal 30°C abgewaschen und vollständig entfernt. Zur leichteren Entfernung von evtl. im Rohr fest gewordenen Testsubstanzen kann ein Wasserstrahl von ca. 30°C eingesetzt werden.

#### 1.5.3.2 TER-Messungen

Der TER wird mit einer Wheastonschen Wechselstrom Messbrücke mit niedriger Spannung gemessen (z.B. AIM 401 oder 6401 oder gleichwertige Meßbrücke). Vor der Messung des elektrischen Widerstands wird die Oberflächenspannung der Haut durch Auftrag von 70%igem Äthanol verringert, wobei die Menge ausreichen soll, um die gesamte Epidermis zu bedecken. Nach einigen Sekunden wird das Äthanol durch Kippen des Rohrs entfernt, und das Gewebe wird durch Hinzufügen von 3ml Magnesiumsulfatlösung (154mM) befeuchtet. Zur Messung des Widerstands in kΩ/Hautstück werden die Elektroden der Messbrücke beidseitig des Hautstücks plaziert (Abb. 2). Die Gesamtabmessungen der Elektroden und die Länge der Elektroden unterhalb der Abgreifklemmen sind in Abb. 1 angegeben. Die Abgreifklemme der inneren (dicken) Elektrode liegt während der Widerstandsmessung oben auf dem PTFE-Rohr auf, um sicherzustellen, dass stets eine gleichbleibende Elektrodenlänge in die Magnesiumsulfatlösung getaucht bleibt. Die äußere (dünne) Elektrode befindet sich innerhalb der Rezeptorkammer an deren Boden. Der Abstand zwischen dem unteren Ende der Federklemme und dem unteren Ende des PTFE-Rohrs bleibt konstant (Abb. 1), da dieser Abstand den erzielten Widerstandswert beeinflusst.

Anmerkung : Wenn der gemessene Widerstandswert über 20 kΩ liegt, so kann dies an einem Rest der Testsubstanz liegen, der die Epidermisoberfläche des Hautstücks bedeckt. Zur Entfernung dieser Schicht kann versucht werden, das mit einem durch Gummihandschuh geschützten Daumen verschlossene PTFE-Rohr ca. 10 Sekunden zu schütteln. Die Magnesiumsulfatlösung wird dann verworfen, und die Widerstandsmessung wird mit frischem Magnesiumsulfat wiederholt.

Die TER-Ergebnisse (Mittelwerte) einer Testsubstanz werden nur angenommen, sofern die Ergebnisse der gleichzeitig getesteten Positivkontrollen und Negativkontrollen innerhalb definierter Akzeptanzgrenzen liegen. Für die beschriebene Methodik und Versuchsordnung werden folgende Kontrollsubstanzen und dazugehörige TER-Akzeptanzbereiche vorgeschlagen :

Kontrolle	Substanz	Widerstandsbereich (kΩ)
Positiv	10M Salzsäure (36%)	0,5 – 1,0
Negativ	Destilliertes Wasser	10 - 25

#### 1.5.3.3 Testvariante für oberflächenaktive Stoffe und neutrale organische Stoffe

Wenn die TER-Werte bei oberflächenaktiven oder neutralen organischen Testsubstanzen 5 kΩ oder weniger betragen, kann eine Beurteilung der Penetration eines Farbstoffes an den Geweben durchgeführt werden. Dieses Verfahren zeigt an, ob die Ergebnisse falsch positiv sind (2).

#### 1.5.3.3.1 Anwendung und Entfernung von Sulforhodamine B-Farbstoff

Nach der Applikation der Testsubstanz zur Bestimmung des TER werden 150µl Sulforhodamin B-Farbstoff in 10%iger (w/v) Verdünnung in destilliertem Wasser für zwei Stunden topisch auf jedes Hautstück aufgebracht. Die Hautstücke werden sodann unter fließendem Wasser von höchstens Raumtemperatur etwa 10 Sekunden lang mit einem Wasserstrahl gewaschen, um überschüssige/ungebundene Farbe zu entfernen. Jedes Hautstück wird sorgfältig vom PTFE-Rohr entfernt und in ein geeignetes verschließbares Gefäß (z.B. ein 20ml Scintillationsfläschchen) mit entionisiertem Wasser (8ml) gebracht. Die Fläschchen werden 5 Minuten lang vorsichtig geschüttelt, um überschüssige/ungebundene Farbe zu entfernen. Nach Wiederholung des Spülvorgangs werden die Hautstücke in Fläschchen mit 5ml 30%igem (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in destilliertem Wasser überführt und über Nacht bei 60° C im Brutschrank aufbewahrt. Nach der Inkubation wird jedes Hautstück entfernt und verworfen, und die verbleibende Lösung wird 8 Minuten lang bei 21° C zentrifugiert (relative Zentrifugalkraft ~175). Eine 1ml-Probe des oberflächenaktiven Stoffs wird sodann 1:5 (v/v) [d.h. 1ml + 4ml] mit 30%iger (w/v) SDS-Lösung in destilliertem Wasser verdünnt. Die optische Dichte (OD) der Lösung wird bei ca. 565nm gemessen.

#### 1.5.3.3.2 Berechnung des Farbgehalts

Der Gehalt an Sulforhodamin B-Farbstoff je Hautstück wird mittels der OD-Werte berechnet (molarer Extinktionskoeffizient von Sulforhodamin B bei 565nm =  $8,7 \times 10^4$ , Molekulargewicht = 580). Der Gehalt an Sulforhodamin B wird für jedes der drei Hautstücke bestimmt und dann der Mittelwert berechnet. Die erhaltenen Mittelwerte der Farbbindung einer Testsubstanz werden nur angenommen, sofern die Ergebnisse der gleichzeitig getesteten Kontrollen innerhalb definierter Akzeptanzgrenzen liegen. Für die beschriebene Methodik und Versuchsanordnung werden folgende Akzeptanzbereiche vorgeschlagen :

Kontrolle	Substanz	Farbgehaltsbereich (µg/Hautstück)
Positiv	10M Salzsäure (36%)	40 - 100
Negativ	Destilliertes Wasser	15 - 35

#### 1.5.3.4 Zusatzinformation

Testsubstanzen können auf die Hautstücke auch für kürzere Zeiträume (z.B. 2 Stunden) aufgebracht werden, um Materialien zu identifizieren, die hochgradig ätzend sind. In der Validierungsstudie zeigte sich jedoch, dass der TER-Test das ätzende Potential mehrerer Testchemikalien nach zweistündiger Einwirkung auf die Hautstücke (2) überbewertet, wenngleich er eine korrekte Identifizierung ätzender und nicht ätzender Stoffe nach 24stündiger Einwirkung gestattet.

Die Eigenschaften und Abmessungen der Versuchsanlage und die angewandte Testmethode können die TER-Werte beeinflussen. Der Schwellenwert von 5 kΩ zur Vorhersage hautätzender Eigenschaften eines Stoffes wurde aufgrund von Daten ermittelt, die mit den hier beschriebenen spezifischen Geräten und Verfahren erzielt wurden. Im Falle einer signifikanten Änderung der Testbedingungen können andere Schwellen- und Kontrollwerte gelten. In diesem Fall empfiehlt es sich, die Methodik und die Widerstandsschwellenwerte durch Austestung einer Reihe von Referenzstandards zu kalibrieren, die aus den in der Validierungsstudie (3) verwendeten Chemikalien auszuwählen sind.

## 1.6 PRINZIP DER TESTMETHODE –TEST MIT MENSCHLICHEM HAUTMODELL

Die Testsubstanz wird bis zu 4 Stunden topisch auf ein dreidimensionales Modell menschlicher Haut aufgebracht, das eine rekonstruierte Epidermis mit funktionaler Hornhaut besitzt. Ätzende Materialien werden aufgrund ihrer Fähigkeit identifiziert, eine Abnahme der Viabilität (Lebensfähigkeit) der Zellen (dies kann beispielsweise durch Anwendung des MTT-Reduktionstests festgestellt werden) unter festgelegte Schwellenwerte bei einer spezifischen Expositionsdauer zu bewirken. Dieses Testprinzip basiert auf der Hypothese, dass ätzende Chemikalien in der Lage sind, (durch Diffusion oder Erosion) die Hornhaut zu durchdringen und darüber hinaus ausreichend cytotoxisch sind, um in den darunterliegenden Zellschichten das Absterben von Zellen zu bewirken.

## 1.7 BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE – TEST MIT MENSCHLICHEM HAUTMODELL

### 1.7.1 Modelle menschlicher Haut

Modelle rekonstruierter menschlicher Haut können aus unterschiedlichen Quellen stammen, müssen jedoch bestimmten Kriterien genügen. Das Modell muss eine funktionale Hornhaut mit einer darunter liegenden Schicht lebender Zellen aufweisen. Die Barrierefunktion der Hornhaut muss angemessen sein. Dies kann durch Nachweis der Widerstandsfähigkeit des Modells gegenüber Substanzen aufgezeigt werden, von denen bekannt ist, dass sie Zellen gegenüber toxisch sind, jedoch normalerweise die Hornhaut nicht durchdringen. Bei Einhaltung definierter Versuchsbedingungen muß das Modell nachweislich reproduzierbare Ergebnisse erbringen.

Die Viabilität der vitalen Zellen des Hautmodells muß hinreichend groß sein, um gut zwischen Positivkontrollen und Negativkontrollen unterscheiden zu können. Die Viabilität der Zellen (z.B. bestimmt durch MTT-Reduktion und gemessen als OD-Wert) nach Exposition mit der Negativkontrolle muss innerhalb der für das jeweilige Modell definierten Akzeptanzgrenzen liegen. Ebenso müssen die Viabilitätswerte nach Exposition mit der Positivkontrolle (ausgedrückt in % der Viabilität der Negativkontrolle) innerhalb der definierten Akzeptanzgrenzen liegen. Es ist unbedingt erforderlich, dass das eingesetzte Modell zur Vorhersage hautätzender Eigenschaften (Prädiktionsmodell) internationalen Validierungsstandards entspricht.

### 1.7.2 Testverfahren

#### 1.7.2.1 Anwendung der Testsubstanzen

Bei flüssigen Materialien muss genügend Testsubstanz appliziert werden, damit die Hautoberfläche ganz bedeckt ist (mindestens 25µl/cm<sup>2</sup>). Bei der Prüfung von Feststoffen muss soviel Testsubstanz aufgebracht werden, dass die Haut ganz bedeckt ist. Diese sind dann anzufeuchten, damit ein guter Kontakt mit der Haut gewährleistet ist. Falls erforderlich sollten Feststoffe vor der Anwendung zu Pulver zermahlen werden. Die Methodik der Applikation muss nachweislich auf ein breites Spektrum unterschiedlicher Chemikaliertypen (2) anwendbar sein. Zum Ende der Expositionszeit muss das Testmaterial sorgfältig mit einer gepufferten isotonischen Salzlösung von der Hautoberfläche abgewaschen werden.

#### 1.7.2.2 Messung der Zellviabilität

Jede validierte quantitative Methode kann zur Messung der Zellviabilität angewendet werden. Die am häufigsten angewandte Methode ist die MTT-Reduktion, die nachweislich in verschiedenen Laboratorien genaue und reproduzierbare Ergebnisse erbracht hat (2). Das Hautstück wird 3 Stunden lang in eine MTT-Lösung von 0,3 mg/ml bei 20-28°C gelegt. Der blaue Formazan-Niederschlag wird sodann extrahiert (Lösemittelextraktion), und die Formazankonzentration wird durch Bestimmung des OD-Wertes bei einer Wellenlänge zwischen 545 und 595nm gemessen.

#### 1.7.2.3 Zusatzinformation

Das verwendete Hautmodell und das genaue Protokoll der Expositionszeit, der Waschverfahren usw. haben einen großen Einfluß auf die erzielten Ergebnisse der Zellviabilität. Es wird daher empfohlen, Methodik und Modell zur Vorhersage hautätzender Eigenschaften durch Austestung einer Reihe von Referenzstandards zu kalibrieren, die aus den in der ECVAM-Validierungsstudie (3) verwendeten Chemikalien auszuwählen sind. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass sich die angewandte Methodik nachweislich reproduzierbar zeigt, d.h. für ein breites Spektrum von Chemikalien sowohl innerhalb eines Laboratoriums, als auch zwischen verschiedenen Laboratorien im Einklang mit internationalen Standards vergleichbare Ergebnisse liefert. Die Methode sollte mindestens den bereits publizierten Kriterien für die wissenschaftliche Validität (2) entsprechen, und die Ergebnisse einer solchen Validierungsstudie müssen in einer unabhängig referierten wissenschaftlichen Zeitschrift veröffentlicht werden.

## 2. DATEN

### 2.1 DARLEGUNG DER ERGEBNISSE

#### 2.1.1 TER-Test an Rattenhaut

Die Widerstandswerte ( $k\Omega$ ) für die Testsubstanz, Positivkontrolle, Negativkontrolle sowie alle Standard-Referenzchemikalien, einschließlich der Einzeldaten von Mehrfachbestimmungen und Wiederholungstests, der Mittelwerte und der davon abgeleiteten Klassifizierung, sollten in Tabellenform aufgeführt werden.

#### 2.1.2 Test mit menschlichem Hautmodell

Die OD-Werte und die relativen Werte der Zellviabilität für die Testsubstanz, die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sowie für alle Standard-Referenzchemikalien, einschließlich der Einzeldaten von Mehrfachbestimmungen und Wiederholungstests, der Mittelwerte und der davon abgeleiteten Klassifizierung, sollten in Tabellenform aufgeführt werden.

### 2.2 BEWERTUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

#### 2.2.1 TER-Test an Rattenhaut

Wenn der für die Testsubstanz erzielte mittlere TER-Wert über  $5k\Omega$  liegt, ist die Substanz nicht ätzend. Beträgt der TER-Wert jedoch  $5k\Omega$  oder weniger, und handelt es sich bei der Testsubstanz nicht um einen oberflächenaktiven oder einen neutralen organischen Stoff, so ist die Testsubstanz ätzend.

Bei oberflächenaktiven oder neutralen organischen Stoffen, die TER-Werte von  $5k\Omega$  oder weniger ergeben, kann ein Test auf Farbstoffpenetration durchgeführt werden. Ist der mittlere Farbgehalt des Hautstücks gleich groß oder größer als der gleichzeitig bestimmte mittlere Farbgehalt des Hautstücks der 36%igen HCl-Positiv-Kontrolle, so ist die Testsubstanz falsch positiv und daher nicht ätzend.

#### 2.2.2 Test mit menschlichem Hautmodell

Der gemessene OD-Wert der Negativkontrolle wird mit einer 100%igen Zellviabilität gleichgesetzt. Folglich können die für jede Testprobe erzielten OD-Werte zur Berechnung einer prozentualen Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle herangezogen werden. Der Schwellenwert der prozentualen Zellviabilität, der zur Unterscheidung zwischen ätzenden und nicht ätzenden Testsubstanzen verwendet wird (oder die Schwellenwerte zur Differenzierung des ätzenden Potentials in weitere Unterklassen), müssen in einem Prädiktionsmodell vor der Validierung der Methode klar definiert sein, und die anschließende Validierungsstudie muss die Richtigkeit dieser Werte bestätigen (2).

## 3. BERICHTERSTATTUNG

### TEST-BERICHT

Der Prüfbericht muss mindestens folgende Informationen enthalten:

#### *Testsubstanz:*

Kenndaten, physikalische Eigenschaften und gegebenenfalls physikalisch-chemische Eigenschaften. Ähnliche Informationen sollten für Referenzsubstanzen vorgelegt werden, sofern sie verwendet werden.

#### *Testbedingungen:*

- Einzelheiten der angewandten Testmethode;
- Beschreibung und Begründung jeglicher Änderungen.



#### Ergebnisse:

- Tabellarische Anordnung der Widerstandswerte (TER-Test) oder der prozentualen Zellviabilität (Test mit menschlichem Hautmodell) für die Testsubstanz, die Positivkontrollen und Negativkontrollen sowie für alle Standard-Referenzchemikalien, einschließlich der Einzeldaten von Mehrfachbestimmungen und Wiederholungsversuchen sowie deren Mittelwerte;
- Beschreibung aller sonstigen beobachteten Wirkungen.

#### Diskussion der Ergebnisse.

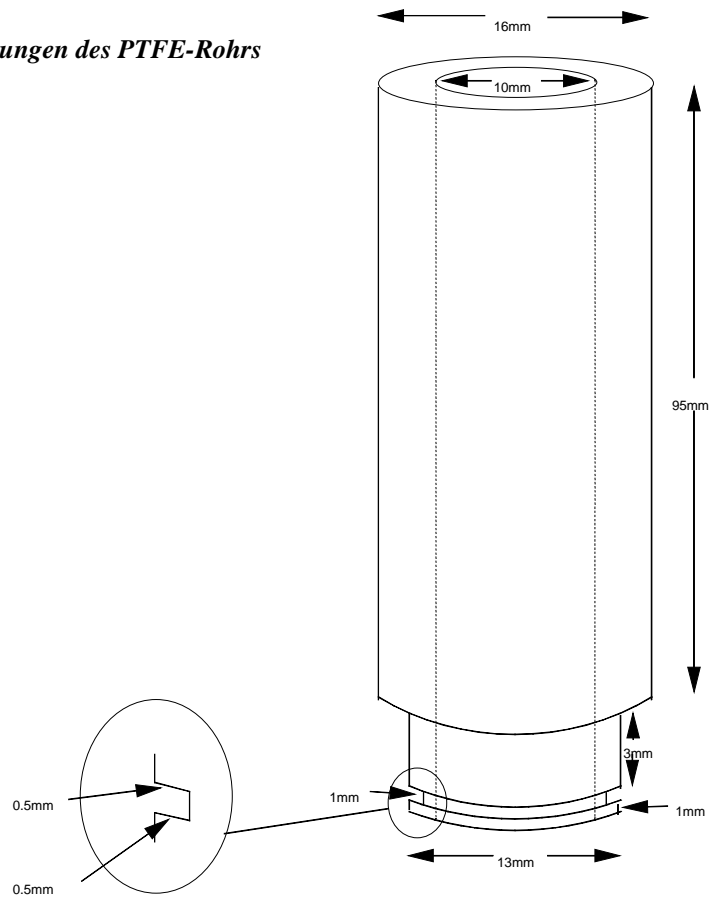
#### Schlußfolgerungen

## LITERATUR

1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275-280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* **12**, 483-524.
3. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro* **12**, 471-482.
4. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test - modifications and validation. *Food & Chemical Toxicology* **24**, 507-512.
5. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxicology in Vitro* **6**, 191-194.
6. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998). An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA* **26**, 709-720.
7. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* **23**, 219-255.

Abb. 1

*Abmessungen des PTFE-Rohrs*



*Abmessungen der Elektrode*

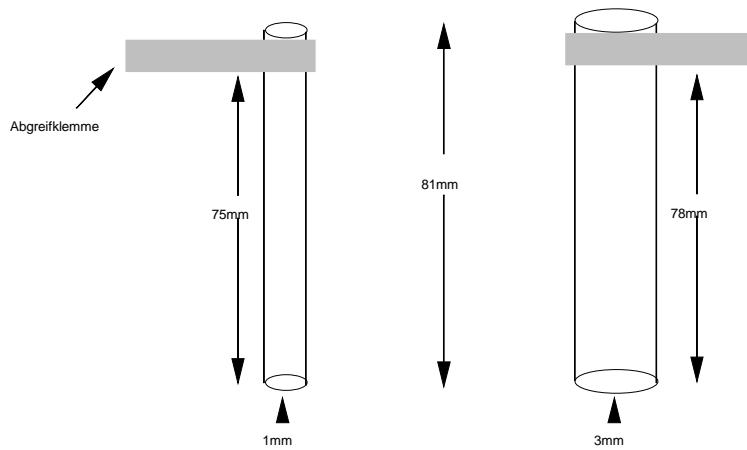
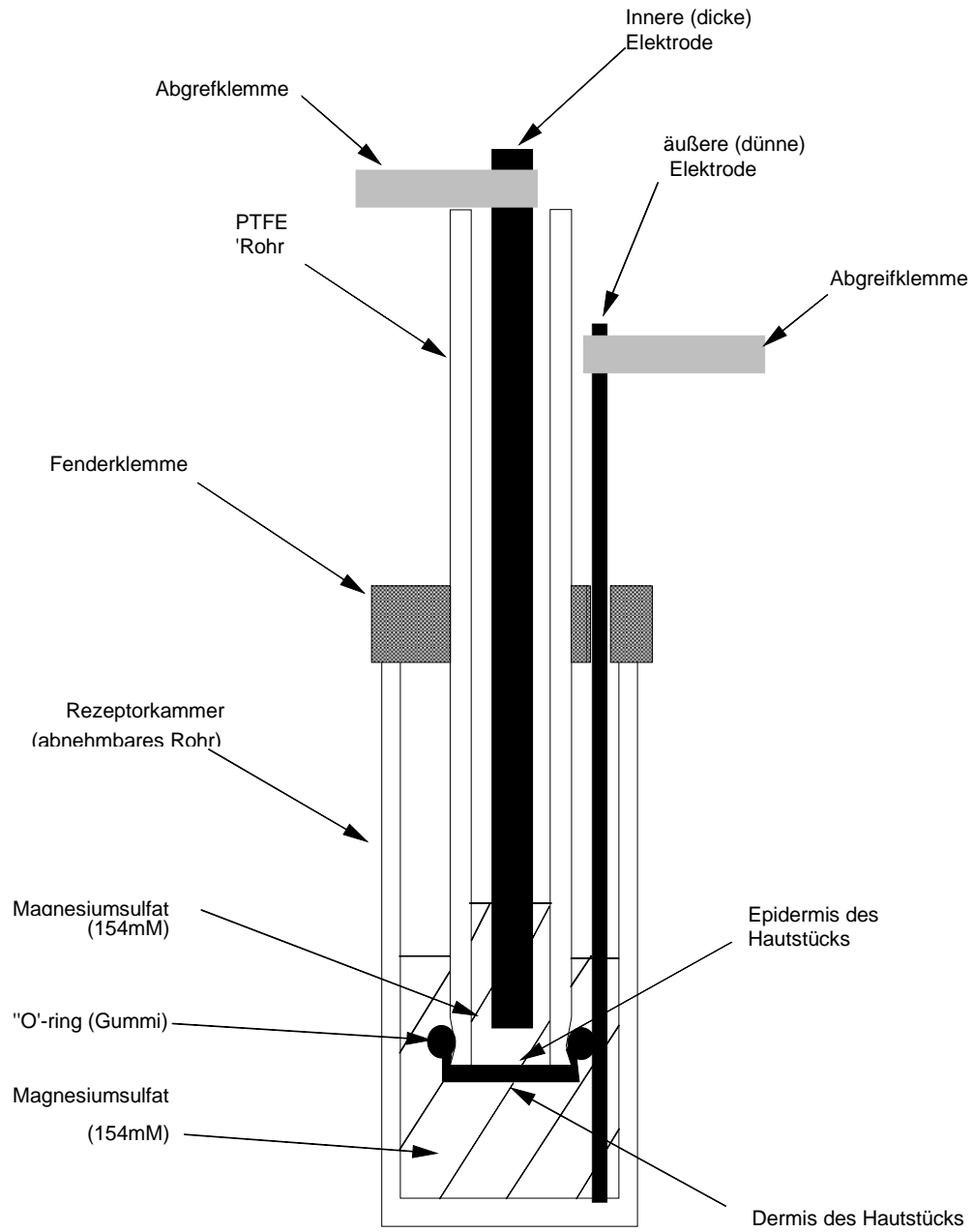


Abb. 2

*Apparatur für den TER-Test mit Rattenhaut*



## B. 41. PHOTOTOXIZITÄT - *IN-VITRO*-3T3-NRU-PHOTOTOXIZITÄTSTEST

### 1. METHODE

#### 1.1 EINLEITUNG

Phototoxizität wird als toxische Reaktion definiert, die nach der ersten Exposition der Haut mit bestimmten Chemikalien bei nachfolgender Lichtexposition entsteht oder auf ähnliche Weise durch Bestrahlung der Haut nach systemischer Verabreichung eines chemischen Stoffes induziert wird.

Die aus dem *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest gewonnenen Informationen dienen der Erfassung des phototoxischen Potentials einer Testsubstanz, d.h. des Vorhandenseins bzw. Nicht-Vorhandenseins möglicher Gefahren durch eine Testsubstanz in Verbindung mit einer Exposition mit UV- und sichtbarem Licht.

Da der toxikologische Endpunkt des *In-vitro*-Tests die Bestimmung der durch die kombinierte Wirkung eines chemischen Stoffs und von Licht induzierten *Photozytotoxizität* ist, können sowohl Verbindungen, die nach systemischer Verabreichung und Aufbringung auf die Haut *in vivo* phototoxisch sind, als auch Verbindungen, die nach topischer Anwendung auf der Haut phototoxische Wirkung (Photoirritation) zeigen, durch den Test erfaßt werden.

Der *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest wurde im Zeitraum 1992-1997 (1)(2)(3) in einem gemeinsamen EU/COLIPA-Projekt entwickelt und validiert, um eine valide *In-vitro*-Alternative zu den verschiedenen gebräuchlichen *In-vivo*-Tests zu etablieren. 1996 empfahl ein OECD-Workshop ein *In-vitro*-Stufen-Testkonzept für die Beurteilung der Phototoxizität (4).

Die Ergebnisse des *In-vitro*-3T3-NR-Phototoxizitätstests wurden mit akuten Phototoxizitäts-/Photoirritationswirkungen *in vivo* bei Tieren und Menschen verglichen, und es zeigte sich, daß der Test in bezug auf diese Wirkungen ausgezeichnete Vorhersagen macht. Der Test ist nicht dazu bestimmt, sonstige negative Wirkungen vorherzusagen, die sich aus der kombinierten Wirkung von Licht und einem chemischen Stoff ergeben können, wie *Photogenotoxizität*, *Photoallergie* und *Photokarzinogenität*, wengleich viele chemische Stoffe, die diese spezifischen Eigenschaften aufweisen, in dem *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest positiv reagieren werden. Ferner ist der Test nicht für die Beurteilung der *phototoxischen Potenz* bestimmt.

Eine sequentielle Prüfstrategie zur Phototoxizitätstestung mit Chemikalien ist in Anhang 1 enthalten.

#### 1.2 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

**Bestrahlungsstärke:** die Intensität des auf eine Oberfläche auftreffenden ultravioletten (UV) oder sichtbaren Lichts, gemessen in  $W/m^2$  oder  $mW/cm^2$ .

**Lichtdosis:** die Menge (= Intensität  $\times$  Zeit) der auf eine Oberfläche auftreffenden ultravioletten (UV) oder sichtbaren Strahlung, ausgedrückt in Joules (=W  $\times$  s) je Oberflächenbereich, z. B.  $J/m^2$  oder  $J/cm^2$ .

**UV Licht, Bandbreiten:** Die von der Internationalen Beleuchtungskommission (CIE) empfohlenen Bezeichnungen sind: UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) and UVC (100-280nm). Andere Bezeichnungen werden ebenfalls verwendet: die Trennung zwischen UVB und UVA erfolgt oft bei 320nm; UVA kann in UV-A1 und UV-A2 unterteilt werden, wobei die Trennung bei ca. 340nm liegt.

**Zell-Viabilität:** Parameter zur Messung der Gesamtaktivität einer Zellpopulation (z. B. Aufnahme des Vitalfarbstoffs 'Neutralrot' in Zell-Lysosomen), die je nach dem gemessenen Endpunkt und der angewandten Versuchsauslegung mit der Gesamtzahl und/oder der Vitalität der Zellen korreliert.

**Relative Zell-Viabilität:** Zell-Viabilität, ausgedrückt in Relation zu Negativkontrollen (Lösemittel), die das gesamte Testverfahren (entweder +UV oder -UV) durchlaufen, jedoch nicht mit einer Testchemikalie behandelt wurden.

**Prädiktionsmodell:** Ein zur Umwandlung der Ergebnisse eines Toxizitätstests in eine Vorhersage des toxischen Potentials angewandter Algorithmus. Im vorliegenden Test können PIF und MPE für die Umwandlung der Ergebnisse des In-vitro-3T3-NRU-Phototoxizitätstests in eine Vorhersage des phototoxischen Potentials verwendet werden.

**PIF (Photoirritationsfaktor):** ein Faktor, der durch Vergleich von zwei gleich wirksamen zytotoxischen Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) der chemischen Testsubstanz in Abwesenheit (-UV) und in Anwesenheit (+UV) nicht-zytotoxischer Strahlung mit UVA/vis-Licht erlangt wird.

**MPE (Mean Photo Effect):** eine neuartige Meßgröße, die von einer mathematischen Analyse der kompletten Form von zwei Konzentrations-Wirkungskurven hergeleitet wurde, die in Abwesenheit (-UV) und in Anwesenheit (+UV) nicht-zytotoxischer Strahlung mit UVA/vis-Licht erzielt wurden.

**Phototoxizität:** eine akute toxische Reaktion, die nach der ersten Exposition der Haut mit bestimmten chemischen Stoffen bei anschließender Lichtexposition entsteht oder die auf ähnliche Weise durch Bestrahlung der Haut nach systemischer Verabreichung eines chemischen Stoffs induziert wird.

**Photoirritation:** ein Unterbegriff von 'Phototoxizität', der verwendet wird, um nur jene phototoxischen Reaktionen zu beschreiben, die auf der Haut nach Exposition mit chemischen Stoffen (topische oder orale Verabreichung) auftreten. Diese phototoxischen Reaktionen führen stets zu nicht-spezifischen Zellschäden (sonnenbrandähnliche Reaktionen).

**Photoallergie:** eine erworbene immunologische Reaktion, die nicht bei der ersten Behandlung mit chemischen Stoffen und Licht auftritt und eine Induktionszeit von einer oder zwei Wochen benötigt, bevor eine Hautreaktion nachgewiesen werden kann.

**Photogenotoxizität:** eine bei einem genetischen Endpunkt beobachtete genotoxische Reaktion, die nach der Exposition von Zellen mit einer nicht-genotoxischen Dosis von UV/sichtbarem Licht und einem nicht-genotoxischen chemischen Stoff auftritt.

**Photokarzinogenität:** durch wiederholte Anwendung von Licht und chemischen Stoffen induzierte Karzinogenität. Der Begriff 'Photo-Co-Karzinogenese' wird verwendet, wenn UV-induzierte Tumorigenese durch einen chemischen Stoff verstärkt wird.

### 1.3 REFERENZSUBSTANZEN

Abgesehen von der Positivkontroll-Chemikalie *Chlorpromazin*, die in jedem Test gleichzeitig mitgetestet werden sollte, wird für die Neuetablierung des 3T3-NRU-Phototoxizitätstests empfohlen, als Referenzchemikalien einige Vertreter der bei diesem Test in den Ringversuchen benutzten Chemikalien zu verwenden (1)(3)(13).

### 1.4 VORBEMERKUNGEN

Bei vielen Klassen von Chemikalien wurde festgestellt, daß sie phototoxische Wirkungen induzieren (5)(6)(7)(8). Ihr einziges gemeinsames Merkmal ist ihre Fähigkeit, Lichtenergie im Sonnenlichtbereich zu absorbieren. Gemäß dem ersten photochemischen Gesetz (dem Grotthaus-Draperschen Gesetz), erfordert die Photoreaktion ausreichende Lichtquantenabsorption. Folglich sollte, bevor eine biologische Testung gemäß der vorliegenden Prüfrichtlinie in Betracht gezogen wird, ein UV/vis-Absorptionsspektrum der Testchemikalie bestimmt werden (z.B. gemäß der OECD-Test Guideline 101). Sofern der molare Extinktions-/Absorptionskoeffizient unter  $10 \text{ Liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  liegt, besitzt der chemische Stoff kein photoreaktives Potential und braucht nicht im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest oder einem anderen biologischen Test auf schädliche photochemische Wirkungen (Anhang 1) getestet zu werden.

### 1.5 PRINZIP DER TESTMETHODE

Vier Mechanismen wurden identifiziert, durch die Lichtabsorption mittels eines (chemischen) Chromophors zu einer phototoxischen Reaktion führen kann (7). Sie alle haben Zellschädigung zur Folge. Daher basiert der *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest auf einem Vergleich der Zytotoxizität eines chemischen Stoffs, die er mit Exposition und ohne Exposition einer nicht-zytotoxischen Dosis UVA/vis-Licht aufweist. Zytotoxizität in diesem Test wird ausgedrückt als konzentrationsabhängige Reduzierung der Aufnahme des Vitalfarbstoffs Neutralrot (NR, (9)) 24 Stunden nach der Bestrahlung und Behandlung mit der Testchemikalie.

Balb/c 3T3-Zellen werden zwecks Bildung eines Monolayers 24 Stunden kultiviert. Zwei "96-well"-Platten je Testchemikalie werden sodann mit acht verschiedenen Konzentrationen der Chemikalie eine Stunde lang vorinkubiert. Daraufhin wird eine der zwei Platten mit einer nicht-toxischen UVA/vis-Lichtdosis von 5 J/cm<sup>2</sup> UVA (+UV-Versuch) bestrahlt, während die andere Platte im Dunkeln aufbewahrt wird (-UV-Versuch). In beiden Platten wird dann das Behandlungsmedium durch ein Kulturmedium ersetzt, und nach weiteren 24 Stunden Inkubation wird die Zellviabilität durch Neutralrot-Aufnahme ("Neutral Red Uptake", NRU) drei Stunden lang bestimmt. Die relative Zellviabilität, ausgedrückt als Prozentsatz unbehandelter Negativkontrollen, wird für jede der acht Testkonzentrationen berechnet. Um das phototoxische Potential vorherzusagen, wird in der Regel der EC<sub>50</sub>-Wert (d.h. die Konzentration, die die Zellviabilität gegenüber unbehandelten Kontrollen um 50% vermindert) der mit (+UV) und ohne (-UV) Strahlung erzielten Konzentrations-Wirkungskurve verglichen.

## 1.6 QUALITÄTSKRITERIEN

*UVA-Sensitivität der Zellen, historische Daten:* Die Zellen sollten regelmäßig auf ihre Empfindlichkeit gegenüber UVA geprüft werden. Die Zellen werden in der im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest angewandten Dichte ausgesät, am darauffolgenden Tag mit UVA-Dosen von 1-9J/cm<sup>2</sup> bestrahlt, und die Zellviabilität wird einen Tag später im NRU-Test bestimmt. Die Zellen entsprechen den Qualitätskriterien, sofern ihre Viabilität nach Bestrahlung mit 5 J/cm<sup>2</sup> UVA nicht weniger als 80% der Viabilität der Dunkelkontrollen beträgt. Bei der höchsten UVA-Dosis von 9 J/cm<sup>2</sup> sollte die Viabilität nicht weniger als 50% der Dunkelkontrollen betragen. Diese Prüfung sollte ca. bei jeder zehnten Passage der Zellen wiederholt werden.

*UVA-Sensitivität der Negativkontroll-Zellen, im einzelnen Test:* Der Test entspricht den Qualitätskriterien, wenn Negativkontrollen (Zellen in EBSS (Earl's Balanced Salt Solution)) mit oder ohne 1% Dimethylsulfid (DMSO) oder 1% Ethanol (EtOH)) in dem +UVA-Versuch eine Viabilität von weniger als 80% der Viabilität nicht-bestrahlter Zellen in demselben Lösemittel des gleichzeitig durchgeführten Dunkelversuchs (-UVA) aufzeigen.

*Viabilität von Negativkontrollen:* Die absolute optische Dichte (OD<sub>540 NRU</sub>), gemessen im NR-Extrakt der Negativkontrollen zeigt, ob die 1×10<sup>4</sup> Zellen, die je "well" ausgesät wurden, bei normaler Verdopplungszeit während der zwei Tage des Tests gut gewachsen sind. Ein Test entspricht den Akzeptanzkriterien, wenn die mittlere OD<sub>540 NRU</sub> unbehandelter Kontrollen ≥ 0,2 beträgt.

*Positivkontrolle:* Ein bekannter phototoxischer chemischer Stoff soll gleichzeitig mit jedem *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest getestet werden. Chlorpromazin (CPZ) wurde als Positivkontrolle in der EU/COLIPA-Validierungsstudie verwendet und wird daher empfohlen. Für mit dem Standardprotokoll im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest getestetes CPZ wurden folgende Test-Akzeptanzkriterien festgelegt: *bestrahltes CPZ (+UVA):* EC<sub>50</sub>= 0,1 bis 2,0 µg/ml, *nicht-bestrahltes CPZ (-UVA):* EC<sub>50</sub> = 7,0 bis 90,0 µg/ml. Der Photoirritationsfaktor (PIF), d.h. die Verschiebung der EC<sub>50</sub> sollte mindestens 6 betragen.

Andere bekannte, für die Chemikalienklasse oder Löslichkeitsmerkmale der bewerteten Testchemikalie geeignete phototoxische Chemikalien, können an Stelle von CPZ als gleichzeitige Positivkontrollen verwendet werden. In diesem Fall sollten die Bereiche der EC<sub>50</sub>-Werte sowie PIF oder MPE auf der Grundlage von historischen Daten in angemessener Form als Akzeptanzkriterien für den Test festgelegt werden

## 1.7 BESCHREIBUNG DER TESTMETHODE

### 1.7.1 Zubereitungen

#### 1.7.1.1 Zellen

Eine permanente Mäuse-Fibroblastenzelllinie - Balb/c 3T3, Klon 31 – entweder von ATCC oder ECACC - wurde in der Validierungsstudie verwendet und wird daher empfohlen. Andere Zellen oder Zelllinien können erfolgreich mit demselben Testprotokoll verwendet werden, wenn die Kulturbedingungen den spezifischen Bedürfnissen der Zellen angepaßt werden, jedoch muß die gleichwertige Eignung der Zellen nachgewiesen werden.

Zellen sollten regelmäßig auf die Abwesenheit von Mykoplasma-Kontamination hin geprüft und nur verwendet werden, sofern die Ergebnisse solcher Prüfungen zufriedenstellend sind.

Da die UVA-Sensitivität von Zellen mit der erreichbaren Passagenzahl zunehmen kann, sollten Balb/c 3T3-Zellen der niedrigsten Passagenzahl, vorzugsweise weniger als 100, verwendet werden. Es ist wichtig, daß die UVA-Sensitivität der Balb/c 3T3 Zellen regelmäßig entsprechend dem in der vorliegenden Prüfrichtlinie beschriebenen Qualitätskontrollverfahren geprüft wird.

#### 1.7.1.2 *Medien und Kulturbedingungen*

Für Routine-Zellpassagen und während des Testverfahrens sollten geeignete Kulturmedien und Inkubationsbedingungen angewendet werden. Für Balb/c 3T3-Zellen sind dies DMEM mit einem Zusatz von 10% Serum neugeborener Kälber, 4 mM Glutamin, Penicillin und Streptomycin sowie Feuchtinkubation bei 37°C / 7.5% CO<sub>2</sub>. Es ist dabei besonders wichtig, daß die Zell-Kulturbedingungen eine Zellzyklus-Zeit innerhalb des normalen historischen Bereichs der verwendeten Zellen oder Zelllinien sicherstellen.

#### 1.7.1.3 *Zubereitung von Kulturen*

Zellen aus der Tiefkühlagerung werden in einem Kulturmedium in angemessener Dichte ausgesät und mindestens einmal vor ihrer Verwendung im *In-vitro*-3T3 NRU-Phototoxizitätstest passagiert.

Für den Phototoxizitätstest werden Zellen in einem Kulturmedium in einer Dichte ausgesät, die sicherstellt, daß die Kulturen zum Ende des Tests, d.h. wenn die Zellviabilität 48 Stunden nach dem Aussäen der Zellen bestimmt wird, ihre maximale Dichte (Konfluenz) noch nicht erreicht haben. Für Balb/c 3T3-Zellen, die in "96-well"-Platten kultiviert werden, beträgt die empfohlene Zelldichte  $1 \times 10^4$  Zellen je "well".

Für jede Testchemikalie werden Zellen identisch in zwei separate "96-well"-Platten gesät, die sodann gleichzeitig während des gesamten Testverfahrens unter identischen Kulturbedingungen behandelt werden, abgesehen von dem Zeitraum, in dem eine der Platten (+UVA/vis) bestrahlt und die andere im Dunkeln (-UVA/vis) aufbewahrt wird.

#### 1.7.1.4 *Stoffwechselaktivierung*

Während die Verwendung metabolisierender Systeme eine allgemeine Voraussetzung für alle In-vitro-Tests für die Vorhersage von genotoxischem und karzinogenem Potential ist, ist bisher im Falle der Phototoxikologie kein chemischer Stoff bekannt, für den eine metabolische Umwandlung erforderlich ist, um in vivo oder in vitro phototoxische Wirkung zu zeigen. Somit wird es weder als notwendig noch als wissenschaftlich gerechtfertigt erachtet, dass dieser Test mit einem Stoffwechselaktivierungssystem durchgeführt wird.

#### 1.7.1.5 *Testsubstanz / Zubereitung*

Testchemikalien müssen unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch zubereitet werden, es sei denn, Haltbarkeitsdaten rechtfertigen eine Lagerung der Präparation. Eine Zubereitung unter Rotlicht kann erforderlich sein, wenn mit einer raschen Photodegradation zu rechnen ist.

Die Testchemikalien sollten in einer gepufferten Salzlösung, z.B. EBSS oder PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), gelöst werden, die, um Interferenzen während der Bestrahlung zu vermeiden, frei sein muß von Proteinbestandteilen und lichtabsorbierenden pH-Indikationsfarben.

Testchemikalien mit eingeschränkter Wasserlöslichkeit sollten in geeigneten Lösemitteln in einem Hundertfachen der gewünschten Endkonzentration gelöst und dann 1:100 mit der gepufferten Salzlösung verdünnt werden. Wenn ein Lösemittel verwendet wird, muß es mit einem konstanten Volumen von 1% (v/v) in allen Kulturen anwesend sein, d.h. sowohl in den Negativkontrollen als auch in allen Konzentrationen der Testchemikalie.

Dimethylsulphoxid (DMSO) und Ethanol (EtOH) sind die empfohlenen Lösemittel. Andere Lösemittel von geringer Zytotoxizität (z.B. Aceton) können angemessen sein, doch sollten sie sorgfältig auf spezifische Eigenschaften, wie Reaktion mit der Testchemikalie, Auslöschung der phototoxischen Wirkung, Einfangen von Radikalen, geprüft werden.

Wirbelmischung (Vortex) und/oder Anwendung von Ultraschall und/oder Erwärmung auf 37°C können, sofern erforderlich, verwendet werden, um die Löslichkeit zu fördern.

### 1.7.1.6 UV-Bestrahlung

*Lichtquelle:* Die Wahl der geeigneten Lichtquelle und geeigneter Filter ist der kritischste Faktor bei der Phototoxizitätstestung. Für Photosensibilisierung sind in der Regel UVA und sichtbare Bereiche verantwortlich (7)(10), während UVB weniger relevant und selbst hochgradig zytotoxisch ist, da es seine Zytotoxizität um ein Tausendfaches zwischen 313 und 280 nm erhöht (11). Kriterien für die Wahl einer geeigneten Lichtquelle sollten die wesentliche Voraussetzung haben, daß die Lichtquelle Wellenlängen aussendet, die von der chemischen Testsubstanz absorbiert werden und daß die (in einer akzeptablen Zeit erreichbare) Lichtdosis für den Nachweis bekannter Photosensibilisatoren ausreicht. Darüber hinaus sollten die jeweils verwendeten Wellenlängen und Dosen, einschließlich der Wärmeemission (Infrarotbereich), für das Testsystem nicht unnötig schädlich sein.

Die Simulierung von Sonnenlicht mit Solarsimulatoren wird als optimale Lichtquelle betrachtet. Sowohl Xenon-Lichtbogenlampen als auch (dotierte) Quecksilber-Metallhalogenid-Lichtbogenlampen werden in Solarsimulatoren verwendet. Letztere haben den Vorteil, daß sie weniger Wärme emittieren und preiswerter sind, doch ist die Übereinstimmung mit dem Sonnenlicht nicht perfekt. Da alle Solarsimulatoren signifikante Mengen UVB aussenden, sollten sie angemessen gefiltert sein, um die hoch zytotoxischen UVB-Wellenlängen zu mindern.

Für den *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest sollte ein Strahlungsspektrum verwendet werden, das praktisch frei von UVB ist (UVA:UVB ~ 1:20). Die spektrale Energieverteilung des in der Validierungsstudie zum *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest verwendeten gefilterten Solarsimulators wurde als Beispiel veröffentlicht (3).

*Dosimetrie:* Die Lichtintensität (Bestrahlungsstärke) sollte regelmäßig vor jedem Phototoxizitätstest unter Verwendung eines geeigneten Breitband-UV-Meters geprüft werden. Das UV-Meter muß für die Lichtquelle kalibriert sein. Die Leistungsfähigkeit des UV-Meters ist sicherzustellen. Zu diesem Zweck wird die Verwendung eines zweiten Referenz-UV-Meters des gleichen Typs und dergleichen Kalibrierung empfohlen. Im Idealfall sollte in größeren Abständen ein Spektroradiometer zur Messung der spektralen Energieverteilung der gefilterten Lichtquelle und zur Prüfung der Kalibrierung des Breitband-UV-Meters verwendet werden, doch erfordern solche Instrumente fachkundige Bedienung durch entsprechend geschultes Personal.

Eine Dosis von 5 J/cm<sup>2</sup> (UVA) wurde in der Validierungsstudie als nicht-zytotoxisch gegenüber Balb/c 3T3-Zellen und als ausreichend stark ermittelt, um selbst schwach phototoxische Chemikalien zu erkennen. Um innerhalb von 50 Minuten 5 J/cm<sup>2</sup> zu erreichen, muß die Bestrahlungsstärke auf 1.666 mW/cm<sup>2</sup> eingestellt werden. Wenn eine andere Zelllinie oder eine unterschiedliche Lichtquelle verwendet werden, kann die UVA-Dosis bei Berücksichtigung der Kriterien der Unschädlichkeit gegenüber Zellen und der ausreichenden Stärke zur Erkennung von Standardphototoxinen geringfügig angepaßt werden. Die Zeit der Lichtexposition wird auf folgendem Wege berechnet:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{Strahlungsdosis}(\text{J}/\text{cm}^2) \times 1000}{\text{Strahlung}(\text{mW}/\text{cm}^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

### 1.7.2 Testbedingungen

Die maximale Konzentration einer Testchemikalie sollte 100 µg/ml nicht überschreiten, da alle phototoxischen Chemikalien bei niedrigeren Konzentrationen erfaßt wurden, während die Inzidenz von falsch positiven Werten bei höheren Konzentrationen zunimmt (13). Der pH der höchsten Konzentration der Testchemikalie sollte zufriedenstellend sein (pH-Bereich: 6,5 – 7,8).

Die in Anwesenheit (+UVA) und in Abwesenheit (-UVA) von Licht zu testenden Konzentrationsbereiche eines chemischen Stoffs sollten angemessen in vorangehenden Vorversuchen ermittelt werden. Bereich und Abstand einer Konzentrationsreihe müssen so gewählt werden, daß Konzentrations-Wirkungskurven ausreichend durch experimentelle Daten gestützt werden. Dazu wird die Verwendung von geometrischen Konzentrationsreihen (mit einem konstanten Verdünnungsfaktor) empfohlen.



### 1.7.3 **Testverfahren<sup>1</sup>**

#### 1.7.3.1 *1. Tag*

Eine Zellsuspension von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml wird in einem Kulturmedium zubereitet, und 100  $\mu$ L Kulturmedium werden nur in die peripheren "wells" einer "96-well"-Gewebskultur Mikrotiterplatte gegeben (=Blindproben). In die übrigen "wells" werden 100  $\mu$ L der Zellsuspension von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml (=  $1 \times 10^4$  Zellen/well) pipettiert. Für jede Testchemikalie werden zwei Platten zubereitet: eine zur Bestimmung von Zytotoxizität (-UVA) und die andere zur Bestimmung von Photozytotoxizität (+UVA).

Die Zellen werden 24 Stunden lang (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C) inkubiert, bis sie einen halbkonfluenten Monolayer bilden. Diese Inkubationszeit stellt die Erholung der Zellen, das Anheften und ein exponentielles Wachstum sicher.

#### 1.7.3.2 *2. Tag*

Nach der Inkubation wird das Kulturmedium abgesaugt. Darauf folgen zwei Waschgänge mit 150  $\mu$ L EBSS/PBS je "well", und 100  $\mu$ L EBSS/PBS, die die geeignete Konzentration der Testchemikalie oder einfach nur Lösemittel (Negativkontrolle) enthält, werden hinzugefügt. Es sind 8 verschiedene Konzentrationen der Testchemikalie zu verwenden. Die Zellen werden mit der Testchemikalie im Dunkeln 60 Minuten lang inkubiert (7,5% CO<sub>2</sub>, 37°C).

Zur Durchführung des (+UVA)-Teils des Tests werden die Zellen bei Raumtemperatur 50 Minuten lang durch den Deckel der "96-well"-Platte mit 1,7 mW/cm<sup>2</sup> UVA (= 5 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Zur Vermeidung von H<sub>2</sub>O-Kondensierung unter dem Deckel wird ein Ventilator eingesetzt. Duplikatplatten (-UVA) werden 50 Minuten lang (= UVA-Expositionszeit) bei Raumtemperatur in einem dunklen Kasten gehalten.

Die Testflüssigkeit wird abgesaugt. Es folgen zwei Waschgänge mit 150  $\mu$ L EBSS/PBS. EBSS/PBS wird durch ein Kulturmedium ersetzt und über Nacht (18-22 h) inkubiert (7,5% CO<sub>2</sub>, 37 °C).

#### 1.7.3.3 *3. Tag*

##### *Mikroskopische Bewertung*

Die Zellen werden unter einem Phasen-Kontrast-Mikroskop untersucht. Eventuelle morphologische Veränderungen der Zelle durch zytotoxische Wirkungen der Testchemikalie werden aufgezeichnet. Diese Prüfung wird empfohlen, um Versuchsirrtümer auszuschalten, doch werden diese Aufzeichnungen nicht für die Bewertung der Zytotoxizität oder Phototoxizität verwendet.

##### *Neutralrot-Aufnahme-Test*

Die Zellen werden mit 150  $\mu$ L vorgewärmter EBSS/PBS gewaschen. Die Waschlösung wird durch vorsichtiges Absaugen entfernt. 100  $\mu$ L des NR-Mediums werden hinzugefügt und bei 37 °C, in feuchter Atmosphäre von 7,5% CO<sub>2</sub>, 3 Stunden lang inkubiert.

Nach der Inkubation wird das NR-Medium entfernt, und die Zellen werden mit 150  $\mu$ L EBSS/PBS gewaschen. Die EBSS/PBS wird vollkommen abgesaugt, und die 96-well-Platten umgekehrt auf "blotting paper" getrocknet. (*Wahlweise* kann die Platte umgekehrt (d.h. mit den wells nach außen) zentrifugiert werden.)

Es werden genau 150  $\mu$ L NR Desorptionslösung (frisch zubereitete Ethanol/Essigsäure) hinzugefügt.

Die Mikrotiter-Platte wird 10 Minuten lang auf einem Mikrotiter-Platten-Schüttler rasch geschüttelt, bis das NR aus den Zellen extrahiert ist und eine homogene Lösung bildet.

Die optische Dichte der NR-Extrakte wird bei 540 nm in einem Spektralphotometer gemessen, wobei die Blindproben als Referenz verwendet werden. Die Daten sind in angemessenem Format (z.B. ASCII) für spätere Analysen aufzuzeichnen.

---

<sup>1</sup> Für weitere Einzelheiten siehe Literaturverzeichnis (12).

## 2 DATEN

### 2.1 QUALITÄT UND QUANTITÄT VON DATEN

Die Daten sollten eine sinnvolle Analyse der in Anwesenheit und in Abwesenheit von UVA/vis-Strahlung erhaltenen Konzentrations-Wirkungsreaktionen gestatten. Sofern Zytotoxizität ermittelt wird, sollten sowohl der Konzentrationsbereich als auch der Abstand einzelner Konzentrationen so gewählt sein, dass die experimentellen Daten in einer Kurve dargestellt werden können. Da eine Testchemikalie bis zu der festgelegten Konzentrationsgrenze von 100 µg/ml im Dunkelversuch (-UVA) nicht zytotoxisch, bei Bestrahlung (+UVA) jedoch hochgradig zytotoxisch sein könnte, ist es möglich, daß die zu prüfenden Konzentrationsbereiche in beiden Teilen des Versuchs einen unterschiedlichen Bereich abdecken müssen, um den Anforderungen zufriedenstellender Datenqualität zu entsprechen. Wenn in beiden Versuchsteilen (-UVA und +UVA) keine Zytotoxizität ermittelt werden kann, ist jedoch ein großer Abstand zwischen den einzelnen Konzentrationen bis zur höchsten Konzentration ausreichend.

Üblicherweise ist die Verifizierung eines klar positiven Ergebnisses durch eine Versuchswiederholung nicht erforderlich. Darüber hinaus müssen klar negative Ergebnisse ebenfalls nicht verifiziert werden, vorausgesetzt, daß die Testchemikalie in genügend hohen Konzentrationen getestet wurde. In solchen Fällen ist ein Hauptversuch zusammen mit einem oder mehreren Vorversuchen ausreichend.

Tests mit Grenzergebnissen nahe der Klassifizierungsgrenze des Prädiktionsmodells sollten zur Überprüfung wiederholt werden.

Wenn Wiederholungstests für erforderlich gehalten werden, können Variationen der Versuchsbedingungen wichtig sein, um zu einem klaren Ergebnis zu gelangen. Eine Schlüsselrolle hat dabei die Zubereitung von Lösungen der Testchemikalie. Folglich können Variationen dieser Bedingungen (zweites Lösemittel, Schütteln, Anwendung von Ultraschall) bei der Wiederholung eines Tests äußerst relevant sein. Als Alternative kann auch eine Änderung der Inkubationszeit vor der Bestrahlung in Betracht gezogen werden, wie z.B. kürzere Zeit für in Wasser instabile Chemikalien.

### 2.2 BEHANDLUNG DER ERGEBNISSE

Sofern möglich, wird die Konzentration einer Testchemikalie bestimmt, die eine 50%ige Hemmung der zellulären Neutral-Rot-Aufnahme (EC<sub>50</sub>) repräsentiert. Dies kann durch Anwendung geeigneter nicht-linearer Regressionsverfahren (vorzugsweise einer Hill-Funktion oder einer logistischen Regression) auf die Konzentrations-Wirkungsdaten oder durch Anwendung sonstiger Fitting-Verfahren (14) erfolgen. Vor Verwendung eines EC<sub>50</sub>-Wertes für weitere Berechnungen sollte die Qualität der Kurvenanpassung angemessen geprüft werden. Als Alternative können graphische Fitting-Methoden zur Berechnung des EC<sub>50</sub> angewendet werden. In diesem Fall wird die Verwendung von Wahrscheinlichkeitspapier (x-Achse: log, y-Achse: probit) empfohlen, da in vielen Fällen die Konzentrations-Wirkungsfunktion nach dieser Umwandlung nahezu linear wird.

### 2.3 ERGEBNISBEWERTUNG (PRÄDIKTIONSMODELLE)

#### 2.3.1 *Prädiktionsmodell- Version 1: Photo-Irritationsfaktor (PIF)*

Wenn sowohl in Anwesenheit (+UVA) als auch in Abwesenheit (-UVA) von Licht komplette Konzentrations-Wirkungskurven erzielt werden, wird ein Photoirritationsfaktor (PIF) durch folgende Formel berechnet:

$$(a) \quad \text{PIF} = \frac{\text{EC}_{50}(-\text{UV})}{\text{EC}_{50}(+\text{UV})}$$

Ein PIF < 5, sagt kein phototoxisches Potential voraus, während ein PIF ≥ 5 ein phototoxisches Potential voraussagt.

Stellt sich ein chemischer Stoff in einem Test nur als zytotoxisch +UVA und als nicht-zytotoxisch -UVA heraus, kann der PIF nicht berechnet werden, auch wenn dies ein Ergebnis darstellt, das auf ein phototoxisches Potential hindeutet. In derartigen Fällen kann ein "> PIF" berechnet werden, wenn der (-UV) Zytotoxizitätstest bis zur höchsten Testkonzentration (C<sub>max</sub>) durchgeführt und dieser Wert für die Berechnung des "> PIF" verwendet wird:

$$(b) \quad > \text{PIF} = \frac{C_{\text{max}}(-\text{UV})}{\text{EC}_{50}(+\text{UV})}$$

Wenn nur ein "> PIF" erzielt werden kann, sagt jeglicher Wert >1 ein phototoxisches Potential voraus.

Wenn sowohl die EC<sub>50</sub> (-UV) als auch die EC<sub>50</sub> (+UV) nicht berechnet werden können, weil ein chemischer Stoff bis zur höchsten Testkonzentration keine Zytotoxizität aufweist, deutet dies darauf hin, daß kein phototoxisches Potential vorliegt. In derartigen Fällen wird ein formaler "PIF = \*1" zur Charakterisierung des Ergebnisses angewandt:

$$(c) \quad \text{PIF} = *1 = \frac{C_{\text{max}}(-\text{UV})}{C_{\text{max}}(+\text{UV})}$$

Wenn nur ein "PIF = \*1" erzielt werden kann, sagt dies voraus, daß kein phototoxisches Potential vorliegt.

In den Fällen (b) and (c), sollten die im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest maximal erreichten Konzentrationen der Testchemikalie bei der Vorhersage des phototoxischen Potentials sorgfältig in Betracht gezogen werden.

### 2.3.2 Prädiktionsmodell - Version 2: Mean-Photo-Effect (MPE)

Als Alternative kann eine neue Version des Modells zur Vorhersage eines phototoxischen Potentials angewandt werden, das mit den Daten der EU/COLIPA-Validierungsstudie (15) entwickelt und unter blinden Bedingungen in einer anschließenden Studie über die *In-vitro*-Phototoxizität von UV-Filter-Chemikalien getestet wurde (13). Dieses Modell hat nicht die Beschränkungen des PIF-Modells in den Fällen, in denen kein EC<sub>50</sub> erzielt werden kann. Das Modell wendet den "Mean Photo Effect" (MPE) an, einen Meßwert, der auf einem Vergleich der kompletten Konzentrations-Wirkungskurven basiert. Für die Anwendung des MPE-Modells wurde eine spezielle Computer-Software an der Humboldt-Universität (Berlin, D.) entwickelt, die kostenlos bezogen werden kann.

## 2.4 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Ein positives Ergebnis im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest (PIF ≥ 5 oder MPE ≥ 0.1) deutet darauf hin, daß die Testsubstanz ein phototoxisches Potential aufweist. Wenn dieses Ergebnis bei Konzentrationen unter 10 µg/ml erzielt wurde, ist zu vermuten, daß die Testchemikalie auch unter verschiedenen Expositionsbedingungen *in vivo* phototoxisch wirkt. Wenn ein positives Ergebnis nur bei der höchsten Testkonzentration von 100 µg/ml erzielt wird, können weitere Überlegungen für die Beurteilung der Gefährlichkeit oder der phototoxischen Potenz erforderlich sein. Dies können Daten über die Penetration, Absorption und mögliche Akkumulation des chemischen Stoffs in der Haut oder die Testung des chemischen Stoffs in einem konfirmativen Alternativtest, wie dem *In-vitro*-Test mit einem menschlichen Hautmodell, sein.

Ein negatives Ergebnis im *In-vitro*-3T3-NRU-Phototoxizitätstest (PIF < 5 oder MPE < 0.1) bedeutet, daß die Testsubstanz für kultivierte Säugerzellen unter den angewandten Versuchsbedingungen nicht phototoxisch war. In Fällen, in denen der chemische Stoff bis zur höchsten Konzentration von 100 µg/ml getestet werden konnte, deutet ein negatives Ergebnis an, daß der chemische Stoff kein phototoxisches Potential besitzt und daß Phototoxizität *in vivo* als unwahrscheinlich gelten kann. In Fällen, in denen identische Konzentrations-Toxizitätsreaktionen (EC<sub>50</sub>+UV und EC<sub>50</sub>-UV) bei niedrigeren Konzentrationen erhalten wurden, wäre die Interpretation der Daten dieselbe. Wenn dagegen +UV und -UV keinerlei Toxizität nachgewiesen wurde und gleichzeitig die Konzentrationswerte auf weniger als 100 µg/ml durch eine eingeschränkte Löslichkeit in wässrigen Systemen beschränkt waren, sollte die Eignung des Tests für die Testsubstanz in Frage gestellt und ein Bestätigungstest erwogen werden (z.B. Verwendung eines *In-vitro*-Hautmodells oder eines *Ex-vivo*-Hautmodells oder eines *In-vivo*-Tests).

## 3 BERICHTERSTATTUNG

### TEST-BERICHT

Der Test-Bericht muß folgende Informationen enthalten:

Testchemikalie:

- Kenndaten und CAS-Nr., sofern bekannt
- physikalische Eigenschaften und Reinheit
- physikalisch-chemische Eigenschaften, die für die Durchführung der Studie relevant sind
- Stabilität und Photostabilität, sofern bekannt

Lösemittel:

- Begründung der Wahl des Lösemittels
- Löslichkeit der Testchemikalie in diesem Lösemittel
- Prozentsatz des in dem Behandlungsmedium (EBSS oder PBS) vorhandenen Lösemittels

#### Zellen:

- Art und Quelle der Zellen
- Abwesenheit von Mykoplasma
- Zahl der Zellpassagen, sofern bekannt
- UVA-Sensitivität von Zellen, bestimmt mit dem im *In vitro*- 3T3-NRU-Phototoxizitätstest verwendeten Bestrahlungsgerät

#### Testbedingungen (a); *Inkubation vor und nach der Behandlung*:

- Art und Zusammensetzung des Kulturmediums
- Inkubationsbedingungen (CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur, Feuchtigkeit)
- Inkubationsdauer (Vorbehandlung, Nachbehandlung)

#### Testbedingungen (b); *Behandlung mit der Chemikalie*:

- Begründung der Wahl der in Anwesenheit und in Abwesenheit von UV/vis-Strahlung verwendeten Konzentrationen der Testchemikalie
- im Falle beschränkter Löslichkeit der Testchemikalie und bei Abwesenheit von Zytotoxizität Begründung der höchsten getesteten Konzentration
- Art und Zusammensetzung des Behandlungsmediums (gepufferte Salzlösung)
- Dauer der chemischen Behandlung

#### Testbedingungen (c); *Bestrahlung*:

- Begründung der Wahl der verwendeten Lichtquelle
- Charakterisierung der spektralen Energieverteilung der Lichtquelle
- Durchlass-/Absorptionsmerkmale des bzw. der verwendeten Filter
- Merkmale des Strahlenmeßgeräts und Einzelheiten der Kalibrierung
- Abstand der Lichtquelle vom Testsystem
- UVA-Strahlung bei dieser Entfernung, ausgedrückt in mW/cm<sup>2</sup>
- Dauer der UV/vis-Lichtexposition
- UVA-Dosis (Strahlung × Zeit), ausgedrückt in J/cm<sup>2</sup>
- Temperatur der Zellkulturen während der Bestrahlung und der gleichzeitig im Dunkeln gehaltenen Zellkulturen

#### Testbedingungen (d); *NRU-Test*

- Zusammensetzung des NR-Mediums
- Dauer der NR-Inkubation
- Inkubationsbedingungen (CO<sub>2</sub>-Konzentration, Temperatur, Feuchtigkeit)
- NR-Extraktionsbedingungen (Extraktionsmittel, Dauer)
- Wellenlänge, die für die photometrische Messung der optischen Dichte von NR verwendet wurde
- zweite Referenzwellenlänge, sofern verwendet
- Inhalt der photometrischen Referenz (Blindprobe), sofern verwendet

#### Ergebnisse

- bei jeder Konzentration der Testchemikalie erhaltene Zell-Viabilität, ausgedrückt als Prozentsatz der mittleren Viabilität der Kontrollen
- Konzentrations-Wirkungskurven (Konzentration der Testchemikalie vs. relative Zell-Viabilität), der gleichzeitig durchgeführten +UVA- und -UVA-Versuche
- Analyse der Konzentrations-Wirkungskurven: sofern möglich, Angabe der EC<sub>50</sub> (+UVA)- und EC<sub>50</sub> (-UVA)-Werte (berechnet mit Computer oder durch anderweitige Verfahren)
- Vergleich der zwei in Anwesenheit und in Abwesenheit von UVA/vis-Bestrahlung erhaltenen Konzentrations-Wirkungskurven entweder durch Berechnung des Photo-Irritationsfaktors (PIF) oder durch Berechnung des Mean Photo Effects (MPE)
- Klassifizierung des phototoxischen Potentials
- Testakzeptanzkriterien (a), *Negativkontrolle des Tests*:
  - absolute Viabilität (optische Dichte des NR-Extrakts) von bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen
  - historische Daten zur Negativkontrolle, Mittelwerte und Standardabweichungen
- Testakzeptanzkriterien (b), *Positivkontrolle des Tests*:
  - EC<sub>50</sub>(+UVA) und EC<sub>50</sub>(-UVA) und PIF der Positivkontroll-Chemikalie
  - historische Daten zur Positivkontroll-Chemikalie: EC<sub>50</sub>(+UVA) und EC<sub>50</sub>(-UVA) und PIF, Mittelwerte und Standardabweichungen

#### Diskussion der Ergebnisse

#### Schlußfolgerungen

1. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro* **8**, 793-796.
2. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA **26**, 7-8.
3. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W and Brantom, P. (1998) EU/COLIPA "*In vitro* phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in Vitro* **12**, 305-327.
4. OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - *OECD Publications Office*, Paris, 1996.
5. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxicology in Vitro* **7**, 95-102.
6. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research progress in organic, biological and medicinal chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
7. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapura, O. and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA **22**, 314-348.
8. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of photobiology"; edited by KC Smith. Plenum Press, New York; 2nd edition, pp. 79-110.
9. Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**, 119-124.
10. Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996). Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology"; edited by FN Marzulli and HI Maibach. Published by Taylor & Francis, Washington DC; 5th Edition, pp. 515-530.
11. Tyrrell R. M. and Pidoux M (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Research* **47**, 1825-1829.
12. ZEBET / ECVAM / COLIPA - Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test. Drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
13. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998). A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test. ATLA **26**, 679-708.
14. Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems* **3**, 127-138.
15. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA **25**, 445-462.

# ANHANG 1

## Rolle des 3T3-NRU PT in einer sequentiellen Prüfstrategie zur Phototoxizitätstestung von Chemikalien

