

ΜΕΡΟΣ Β: ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ
ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ: ΜΕΡΟΣ Β

Α. ΕΠΕΞΗΓΗΜΑΤΙΚΗ ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Για τους σκοπούς της παρούσας εισαγωγής, ισχύει η ακόλουθη αρίθμηση:

B.15 Μετάλλαξη γονιδίων - *Saccharomyces cerevisiae*.

B.16 Μιτωτικός ανασυνδυασμός, *Saccharomyces cerevisiae*.

B.17 Κύτταρο θηλαστικού in vitro - Δοκιμή μετάλλαξης γονιδίου.

B.18 Βλάβη και επιδιόρθωση DNA - απρογραμμάτιστη σύνθεση DNA σε κύτταρα θηλαστικών - in vitro.

B.19 Μέθοδος ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων in vitro.

B.20 Δοκιμή θανατηφόρου φυλοσυνδέτου υπολειπομένου χαρακτήρος σε *Drosophila melanogaster*.

B.21 Δοκιμή μετασχηματισμού κυττάρων θηλαστικών in vitro.

B.22 Δοκιμή θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος σε τρωκτικά.

B.23. ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

B.24 Δοκιμή κηλίδας σε ποντικό.

B.25 Κληρονομήσιμη μετατόπιση γονιδίων σε ποντικούς.

B.26 Μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται από το στόμα: Μελέτη επαναλαμβανόμενης δόσης 90 ημερών από το στόμα σε τρωκτικά.

B.27 Μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται από το στόμα: Επαναλαμβανόμενη δόση 90 ημερών από το στόμα σε μη τρωκτικά.

B.28 Μελέτη υποχρόνιας δερματικής τοξικότητας ουσιών: Επαναλαμβανόμενη δόση 90 ημερών στο δέρμα σε τρωκτικά.

B.29 Μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται με την εισπνοή: Επαναλαμβανόμενη δόση εισπνοής, 90 ημερών, σε τρωκτικά.

B.30 Δοκιμή χρόνιας τοξικότητας.

B.31 Μελέτη τερατογενετικότητας σε τρωκτικά και μη τρωκτικά.

B.32 Δοκιμή καρκινογενετικότητας.

B.33 Συνδυασμένη δοκιμή καρκινογενετικότητας και χρόνιας τοξικότητας.

B.34 Δοκιμή τοξικότητας στην αναπαραγωγή μιάς γενεάς.

B.35 Δοκιμή τοξικότητας στην αναπαραγωγή δύο γενεών.

B.36 Τοξικοκινητική.

Β. ΓΕΝΙΚΟΙ ΟΡΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΩΝ ΟΡΩΝ ΣΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ
ΔΟΚΙΜΩΝ ΤΟΥ ΠΑΡΟΝΤΟΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ

i) Η οξεία τοξικότητα περιλαμβάνει τις δυσμενείς επιπτώσεις που εμφανίζονται μέσα σε δεδομένο χρονικό διάστημα (συνήθως 14 ημέρες) μετά από χορήγηση μιάς μόνο δόσης μιάς ουσίας.

ii) Η έκδηλη τοξικότητα είναι ένας γενικός όρος που περιγράφει σαφείς τοξικές επιπτώσεις μετά από χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας. Αυτές πρέπει να επιτρέπουν την εκτίμηση του κινδύνου και να είναι τέτοιες ώστε η αύξηση της χορηγούμενης δόσης να αναμένεται ότι θα προκαλέσει σοβαρές τοξικές εκδηλώσεις και πιθανώς θνησιμότητα.

iii) Δόση είναι η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας. Η δόση εκφράζεται ως βάρος (g ή mg) ή ως βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματόζωου (π.χ. mg/kg βάρους σώματος) ή σε σταθερές διαιτητικές συγκεντρώσεις (ppm ή mg/kg τροφής).

iv) Η διακρίνουσα δόση (discriminating dose) είναι το υψηλότερο από τα τέσσερα επίπεδα σταθερής δόσης που μπορεί να χορηγηθεί χωρίς να προκαλέσει συνακόλουθη θνησιμότητα (συμπεριλαμβανομένης της θανάτωσης με ανώδυνο τρόπο).

v) Δοσολογία είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια της χορήγησής της.

vi) LD50 (μέση θανατηφόρος δόση) είναι η στατιστικά υπολογισμένη εφάπαξ δόση μιας ουσίας,

η οποία αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο στο 50 % των ζώων στα οποία χορηγήθηκε. Η LD50 εκφράζεται σε βάρος της ελεγχόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους του πειραματοζώου (mg/kg).

vii) LC50 (μέση θανατηφόρος συγκέντρωση) είναι η στατιστικά υπολογισμένη συγκέντρωση μιας ουσίας, η οποία αναμένεται να προκαλέσει το θάνατο κατά την έκθεση ή σε προκαθορισμένο χρόνο μετά την έκθεση, στο 50 % των εκτεθέντων σ' αυτή ζώων για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα.

Η τιμή της LC50 εκφράζεται ως βάρος ελεγχόμενης ουσίας ανά σταθερό όγκο αέρα (mg/l).

viii) NOAEL (συντομογραφία του no observed adverse effect level - επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις) είναι η υψηλότερη δόση ή το υψηλότερο επίπεδο έκθεσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις συνδεδεμένες με την αγωγή.

ix) Η τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης-υποχρόνια περιλαμβάνει τις δυσμενείς επιπτώσεις που εμφανίζονται στα πειραματοζώα σαν αποτέλεσμα των επανειλημμένων ημερήσιων χορηγήσεων μιας χημικής ουσίας, ή εκθέσεων σ' αυτή, για ένα βραχύ διάστημα της αναμενόμενης διάρκειας ζωής τους.

x) Μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ) είναι το υψηλότερο επίπεδο δόσης που προκαλεί, στο πλαίσιο της δοκιμής που χρησιμοποιείται, τοξικές εκδηλώσεις σε ζώα χωρίς να έχει μείζονες επιπτώσεις στην επιβίωσή τους.

xi) Δερματικός ερεθισμός είναι η εμφάνιση φλεγμονωδών αλλοιώσεων στο δέρμα μετά την επίθεση της ελεγχόμενης ουσίας.

xii) Ερεθισμός οφθαλμού είναι η εμφάνιση αλλοιώσεων στον οφθαλμό μετά την επίθεση της ελεγχόμενης ουσίας στην εμπρόσθια επιφάνεια του οφθαλμού.

xiii) Ευαισθητοποίηση του δέρματος (αλλεργική δερματίτις εξ επαφής) είναι η δερματική αντίδραση σε μια ουσία μέσω της ανοσολογικής οδού.

xiv) Δερματική διάβρωση είναι η εμφάνιση μη αντιστρεπτής βλάβης στον δερματικό ιστό μετά την επίθεση της ελεγχόμενης ουσίας για χρονικό διάστημα από 3 λεπτά έως 4 ώρες.

xv) Τοξικοκινητική είναι η μελέτη της απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού και απέκκρισης των ελεγχόμενων ουσιών.

xvi) Απορρόφηση είναι η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η χορηγούμενη ουσία εισέρχεται στο σώμα.

xvii) Απέκκριση είναι η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η χορηγούμενη ουσία και/ή τα προϊόντα μεταβολισμού της αποβάλλονται από το σώμα.

xviii) Κατανομή είναι η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η απορροφηθείσα ουσία και/ή τα προϊόντα μεταβολισμού της κατανέμονται στο σώμα.

xix) Μεταβολισμός είναι η διαδικασία ή οι διαδικασίες με τις οποίες η δομή της χορηγούμενης ουσίας μεταβάλλεται μέσα στο σώμα με ενζυματικές αντιδράσεις.

Β.1 Οξεία τοξικότητα - Υποχρόνια και χρόνια τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης

Η αξιολόγηση της οξείας τοξικότητας μίας ουσίας ή της τοξικότητας επί ενός οργάνου ή συστήματος μπορεί να γίνει με διάφορες δοκιμές (μέθοδοι Β.1 - Β.5), οι οποίες παρέχουν προκαταρκτικές ενδείξεις για την τοξικότητα μετά τη χορήγηση μιας και μόνο δόσης.

Ανάλογα με την τοξικότητα της ουσίας είναι δυνατόν να επιλεγεί μία προσέγγιση οριακής δοκιμής για τον προσδιορισμό της LD50, αν και για τις μελέτες της αναπνευστικής τοξικότητας δεν έχουν καθοριστεί οριακές δοκιμές διότι δεν κατέστη δυνατόν να καθορισθεί οριακή τιμή για την εφάπαξ αναπνευστική έκθεση.

Ιδιαίτερα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν το μικρότερο δυνατό αριθμό πειραματοζώων και περιορίζουν στο ελάχιστο την ταλαιπωρία τους όπως, επί παραδείγματι, η μέθοδος της σταθερής δόσης (μέθοδος Β.1α) και η μέθοδος κλάσης οξείας τοξικότητας (μέθοδος Β.1β). Για δοκιμή επιπέδου 1, μια μελέτη σ' ένα δεύτερο είδος ζώου μπορεί να συμπληρώσει τα συμπεράσματα από την πρώτη μελέτη. Στην περίπτωση αυτή, είναι δυνατόν είτε να χρησιμοποιηθεί μια τυποποιημένη μέθοδος δοκιμής είτε μία προσαρμογή της μεθόδου με μικρότερο αριθμό πειραματοζώων.

Η δοκιμή τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση (μέθοδοι B.7, B.8 και B.9) περιλαμβάνει εκτίμηση των τοξικών επιδράσεων που οφείλονται σε επανειλημμένη έκθεση. Τονίζεται η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των πειραματόζωων προκειμένου να ληφθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες. Οι δοκιμές αυτές θα πρέπει να συμβάλουν στον εντοπισμό των οργάνων στόχων της τοξικότητας καθώς και των τοξικών και μη τοξικών δόσεων. Είναι δυνατόν να απαιτηθεί περαιτέρω εις βάθος διερεύνηση των πτυχών αυτών στο πλαίσιο μακροπρόθεσμων μελετών (μέθοδοι B.26 - B.30 και B.33).

B.II Μεταλλαξιγένεση - Γονιδιοτοξικότητα

Ο όρος μεταλλαξιγένεση αναφέρεται στην πρόκληση μόνιμων μεταβιβάσιμων μεταβολών στην ποσότητα ή στη δομή του γενετικού υλικού των κυττάρων ή οργανισμών. Οι μεταβολές αυτές, "μεταλλάξεις", είναι δυνατόν να αφορούν ένα και μόνο γονίδιο, τμήματα γονιδίων, ομάδες γονιδίων, ή ολόκληρα χρωμοσώματα. Οι επιδράσεις στα ολόκληρα χρωμοσώματα μπορούν να είναι δομικού ή/και αριθμητικού χαρακτήρα.

Η μεταλλαξιγόνο δράση μιας ουσίας εκτιμάται με *in vitro* δοκιμές προσδιορισμού των (σημειακών) γονιδιακών μεταλλάξεων στα βακτηρίδια (μέθοδος B.13/14) και/ή των χρωμοσωμικών δομικών ανωμαλιών σε κύτταρα θηλαστικών (Μέθοδος B.10).

Διαδικασίες *in vivo* όπως, επί παραδείγματι, η δοκιμασία μικροπυρήνων (μέθοδος B.12) ή η ανάλυση της μετάφασης στα κύτταρα του μυελού των οστών, (μέθοδος B.11), είναι επίσης αποδεκτές. Εντούτοις, εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, προτιμούνται σαφώς οι διαδικασίες *in vitro*.

Όταν πρόκειται για παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων και/ή για τη διεξαγωγή ή επέκταση της εκτίμησης κινδύνου, ενδέχεται να απαιτούνται πρόσθετες μελέτες με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της μεταλλαξιγένεσης ή τον προέλεγχο της καρκινογένεσης. Αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς, όπως την επαλήθευση αποτελεσμάτων ληφθέντων για το βασικό φάκελλο, τη διερεύνηση τελικών σημείων ελέγχου που δεν μελετήθηκαν στο πλαίσιο του βασικού φακέλλου, την έναρξη ή επέκταση μελετών *in vivo*.

Για το σκοπό αυτό, οι μέθοδοι B.15 έως B.25 περιλαμβάνουν ευκαρυωτικά συστήματα τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* καθώς και ένα εκτεταμένο φάσμα βιολογικών τελικών σημείων ελέγχου. Οι δοκιμές αυτές παρέχουν πληροφορίες για τις σημειακές μεταλλάξεις και για άλλα τελικά σημεία ελέγχου σε οργανισμούς πιο σύνθετους από τα βακτηρίδια που χρησιμοποιούνται για το βασικό φάκελο.

Εν γένει, κατά την εξέταση ενός προγράμματος περαιτέρω μελετών μεταλλαξιγένεσης, η σχεδίαση πρέπει να γίνεται με τρόπο που να παρέχει κατάλληλες πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με το μεταλλαξιγόνο και/ή καρκινογόνο δυναμικό της εξεταζόμενης ουσίας.

Η καταλληλότητα μιας μελέτης σε μια συγκεκριμένη περίπτωση θα εξαρτηθεί από πολλούς παράγοντες, όπως τα χημικά και φυσικά χαρακτηριστικά της ουσίας, τα αποτελέσματα των αρχικών βακτηριολογικών και κυτταρογενετικών δοκιμών, το μεταβολικό χαρακτήρα της ουσίας, τα αποτελέσματα άλλων τοξικολογικών μελετών και τις γνωστές χρήσεις της ουσίας.

Ένα αυστηρό πρόγραμμα επιλογής δοκιμών είναι, ως εκ τούτου, ακατάλληλο δεδομένης της ποικιλίας των παραγόντων που θα πρέπει ενδεχομένως να ληφθούν υπόψη.

Ορισμένες γενικές αρχές για τη στρατηγική των δοκιμών καθορίζονται στην οδηγία 93/67/ΕΟΚ, αλλά σαφείς στρατηγικές περιλαμβάνονται στο τεχνικό έγγραφο οδηγιών για την εκτίμηση του κινδύνου το οποίο μπορεί ωστόσο να χρησιμοποιηθεί με ευελιξία και να προσαρμοστεί ανάλογα με την περίπτωση.

Οι μέθοδοι περαιτέρω μελέτης ταξινομούνται κατωτέρω με βάση το κύριο γενετικό τελικό σημείο ελέγχου:

Μελέτες για τη διερεύνηση γενετικών (σημειακών) μεταλλάξεων

α) Μελέτες πρόσω ή αντίστροφης μετάλλαξης με τη χρήση ευκαρυωτικών μικροοργανισμών (*Saccharomyces cerevisiae* - σακχαρομύκης του ζύθου) (μέθοδος B.15)

β) Μελέτες *in vitro* για τη διερεύνηση της πρόσω μετάλλαξης σε κύτταρα θηλαστικών (μέθοδος B.17)

γ) Δοκιμή θανατηφόρου φυλοσύνδετου υποτελούς χαρακτήρα σε *Drosophila melanogaster* (μέθοδος B.20)

δ) Δοκιμή μετάλλαξης σωματικών κυττάρων *in vivo*, δοκιμή κηλίδος σε ποντικό (μέθοδος B.24)
Μελέτες για τη διερεύνηση χρωμοσωμικών ανωμαλιών

α) Κυτταρογενετικές μελέτες *in vivo* σε θηλαστικά. Η ανάλυση μετάφασης κυττάρων μυελού των οστών *in vivo* θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη εάν δεν έχει περιληφθεί στην αρχική εκτίμηση (μέθοδος B.11). Εκτός αυτού, μπορεί να διερευνηθεί η κυτταρογενετική των γονιδιακών κυττάρων *in vivo* (μέθοδος B.23)

β) Κυτταρογενετικές μελέτες *in vitro* σε κύτταρα θηλαστικών, εάν δεν έχουν περιληφθεί στην αρχική εκτίμηση (μέθοδος B.10)

γ) Μελέτες θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρα σε τρωκτικά (μέθοδος B.22)

δ) Δοκιμή κληρονομίσιμης μετατόπισης γονιδίων ποντικού (μέθοδος B.25)

Γονιδιοτοξικές επιδράσεις - επιδράσεις στο DNA

Η γονιδιοτοξικότητα η οποία ορίζεται ως ενδεχόμενη επιβλαβής επίδραση στο γενετικό υλικό μη συνδεδεμένη αναγκαστικά με τη μεταλλαξιγένεση μπορεί να υποδεικνύεται από την προκληθείσα βλάβη στο DNA χωρίς να υπάρχει άμεση ένδειξη μετάλλαξης. Για την έρευνα αυτή μπορεί να είναι κατάλληλη μια από τις παρακάτω μεθόδους που χρησιμοποιούν ευκαριωτικούς μικροοργανισμούς ή κύτταρα θηλαστικών:

α) Μιτωτικός ανασυνδυασμός σε *Saccharomyces cerevisiae* - σακχαρομύκητα του ζύθου (μέθοδος B.16)

β) Βλάβη και επιδιόρθωση του DNA - απρογραμμάτιστη σύνθεση DNA - σε κύτταρα θηλαστικών - *in vitro*, (μέθοδος B.18)

γ) Ανταλλαγή αδελφών χρωματίδων σε κύτταρα θηλαστικών - *in vitro* (μέθοδος B.19)

Εναλλακτικές μέθοδοι για τη διερεύνηση του καρκινογόνου δυναμικού

Υπάρχουν δοκιμές μετασχηματισμού κυττάρων θηλαστικών που μετρούν την ικανότητα μιας ουσίας να προκαλέσει μεταβολές μορφολογίας και συμπεριφοράς σε καλλιέργειες κυττάρων, οι οποίες πιστεύεται ότι συνδέονται με κακοήγη μετασχηματισμό - *in vivo* (μέθοδος B.21).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι κυττάρων και κριτήρια μετασχηματισμού.

Εκτίμηση του κινδύνου για κληρονομίσιμες επιδράσεις σε θηλαστικά

Υπάρχουν μέθοδοι για τη μέτρηση των κληρονομίσιμων επιδράσεων σε ολόκληρα θηλαστικά οι οποίες παρήχθησαν από (σημειακές) μεταλλάξεις γονιδίων, όπως είναι η δοκιμασία ειδικής θέσης σε ποντικό, για τη μέτρηση της μετάλλαξης των γονιδιακών κυττάρων στην πρώτη γενεά (δεν περιλαμβάνεται στο παρόν παράρτημα), ή για χρωμοσωμικές ανωμαλίες, όπως είναι η δοκιμή κληρονομίσιμης μετατόπισης γονιδίων ποντικού (μέθοδος B.25). Οι εν λόγω μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την εκτίμηση του πιθανού γενετικού κινδύνου μίας ουσίας για τον άνθρωπο. Ωστόσο, δεδομένου του περίπλοκου χαρακτήρα των δοκιμών αυτών και του ιδιαίτερα μεγάλου αριθμού απαιτούμενων πειραματόζωων, ιδίως για τη δοκιμή ειδικής θέσης, απαιτείται, πριν από την ανάληψή τους, σοβαρή αιτιολόγηση.

B.III Καρκινογένεση

Οι καρκινογόνες χημικές ουσίες διακρίνονται σε γονιδιοτοξικές ή μη γονιδιοτοξικές ανάλογα με τον τεκμαιρόμενο μηχανισμό δράσης.

Προκαταρκτικές πληροφορίες για το γονιδιοτοξικό καρκινογόνο δυναμικό μιας ουσίας μπορούν να ληφθούν από μελέτες μεταλλαξιγένεσης/γονιδιοτοξικότητας. Πρόσθετες πληροφορίες μπορούν να ληφθούν από τις δοκιμές επαναλαμβανόμενης δόσης υποχρόνιας ή χρόνιας τοξικότητας. Η δοκιμή τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, μέθοδος B.7, καθώς και μελέτες επαναλαμβανόμενης δόσης μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας περιλαμβάνουν εκτίμηση των παρατηρούμενων ιστοπαθολογικών μεταβολών στις δοκιμές τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, όπως π.χ. η υπερπλασία ορισμένων ιστών που θα μπορούσε να είναι ανησυχητική. Οι μελέτες αυτές καθώς και πληροφορίες σχετικά με την τοξικοκινητική μπορούν να συμβάλουν στον εντοπισμό χημικών ουσιών με καρκινογόνο δυναμικό με αποτέλεσμα να απαιτηθεί ενδεχομένως περαιτέρω εις βάθος διερεύνηση του εν λόγω θέματος με μία δοκιμή

καρκινογένεσης (μέθοδος B.32) είτε, συχνά με μία συνδυασμένη μελέτη χρόνιας τοξικότητας/καρκινογένεσης (μέθοδος B.33)

B.IV Τοξικότητα για την αναπαραγωγή

Η τοξικότητα στην αναπαραγωγή μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορους τρόπους όπως η εξασθένηση της αναπαραγωγικής λειτουργίας ή ικανότητας αρσενικών και θηλυκών ζώων, που ταυτοποιείται ως "επιπτώσεις στη γονιμότητα", ή πρόκληση μη κληρονομήσιμων επιβλαβών δράσεων στους απογόνους, που ταυτοποιείται ως "τοξικότητα στην ανάπτυξη" όπου περιλαμβάνονται και η τερατογένεση και οι επιδράσεις κατά τη γαλουχία.

Για τις μελέτες της τερατογενετικότητας ως τμήμα των δοκιμών τοξικότητας στην ανάπτυξη, η μέθοδος δοκιμής (μέθοδος B.31) αφορά κυρίως τη χορήγηση από το στόμα. Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες οδοί ανάλογα με τις φυσικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας ή με την πιθανή οδό έκθεσης του ανθρώπου στην ουσία. Στις περιπτώσεις αυτές, η μέθοδος δοκιμής πρέπει να προσαρμόζεται καταλλήλως λαμβάνοντας υπόψη τα ανάλογα στοιχεία των μεθόδων δοκιμής 28 ημερών.

Όταν απαιτείται δοκιμή αναπαραγωγής (γονιμότητας) τριών γενεών, η περιγραφόμενη για την αναπαραγωγή δύο γενεών δοκιμή (μέθοδος B.35) μπορεί να επεκταθεί για να καλύψει και τρίτη γενεά.

B.V Νευροτοξικότητα

Η νευροτοξικότητα μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορους τρόπους, όπως οι λειτουργικές μεταβολές και/ή οι δομικές και βιοχημικές μεταβολές στο κεντρικό ή στο περιφερειακό νευρικό σύστημα. Μια προκαταρκτική ένδειξη νευροτοξικότητας μπορεί να ληφθεί από τις δοκιμές οξείας τοξικότητας. Στη δοκιμή τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, μέθοδος B.7, περιλαμβάνεται εκτίμηση των νευροτοξικολογικών επιδράσεων και τονίζεται η ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των ζώων ώστε να ληφθούν οι περισσότερες δυνατές πληροφορίες. Η μέθοδος αναμένεται να συμβάλει στον εντοπισμό χημικών ουσιών με νευροτοξικό δυναμικό, για τις οποίες θα απαιτηθεί ενδεχομένως περαιτέρω σε βάθος διερεύνηση του εν λόγω θέματος. Επιπλέον, είναι σημαντικό να εξεταστεί η δυνατότητα προκλήσεως από ορισμένες ουσίες ειδικών νευροτοξικών επιδράσεων μη δυναμένων να ανιχνευθούν με άλλες τοξικολογικές μελέτες. Έχει παρατηρηθεί, επί παραδείγματι, ότι ορισμένες οργανοφωσφορικές ενώσεις προκαλούν εκ των υστέρων εκδηλούμενη νευροτοξικότητα η οποία μπορεί να εκτιμηθεί με τις μεθόδους B.37 και B.38 μετά από εφάπαξ έκθεση ή με επαναλαμβανόμενη δόση.

B.VI Ανοσοτοξικότητα

Η ανοσοτοξικότητα μπορεί να ανιχνευθεί με διάφορους τρόπους, όπως π.χ. ανοσοκαταστολή και/ή ενίσχυση της απόκρισης του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα είτε υπερευαισθησία είτε επαγόμενη αυτοανοσία. Η δοκιμή τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση, μέθοδος B.7 περιλαμβάνει εκτίμηση των ανοσοτοξικών επιδράσεων. Η μέθοδος αναμένεται να συμβάλει στον εντοπισμό χημικών ουσιών με ανοσοτοξικό δυναμικό, για τις οποίες θα απαιτηθεί ενδεχομένως περαιτέρω σε βάθος διερεύνηση του εν λόγω θέματος.

B.VII Τοξικοκινητική

Οι τοξικοκινητικές μελέτες συμβάλλουν στην ερμηνεία και αξιολόγηση των τοξικολογικών δεδομένων. Αποσκοπούν στην αποσαφήνιση συγκεκριμένων τοξικολογικών πτυχών της ελεγχόμενης ουσίας και τα αποτελέσματά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό περαιτέρω τοξικολογικών μελετών. Δεν προβλέπεται προσδιορισμός του συνόλου των παραμέτρων σε κάθε περίπτωση. Μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις, θα απαιτηθεί διεξαγωγή όλης της σειράς των τοξικοκινητικών μελετών (απορρόφηση, απέκκριση, κατανομή και μεταβολισμός). Για ορισμένες ενώσεις ενδείκνυνται ενδεχομένως αλλαγές στη σειρά αυτή ή είναι δυνατόν να επαρκεί μελέτη με εφάπαξ δόση (μέθοδος B.36).

Πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή (σχέση δομής-δράσης) και τις φυσικοχημικές ιδιότητες μπορούν επίσης να παρέχουν ενδείξεις για τα χαρακτηριστικά της απορρόφησης από την προβλεπόμενη οδό χορήγησης καθώς και για τις δυνατότητες μεταβολισμού και κατανομής στους ιστούς. Πληροφορίες για τις τοξικοκινητικές παραμέτρους μπορούν επίσης να ληφθούν

από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας και τοξικοκινητικής.

Γ. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗΣ ΟΥΣΙΑΣ

Η σύνθεση της ελεγχόμενης ουσίας, συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων και οι σχετικές φυσικοχημικές ιδιότητές της, συμπεριλαμβανομένης της σταθερότητας, πρέπει να είναι γνωστές πριν από την έναρξη οποιασδήποτε μελέτης τοξικότητας.

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την επιλογή της οδού χορήγησης, τη σχεδίαση κάθε ιδιαίτερης μελέτης, το χειρισμό και τη φύλαξη της ελεγχόμενης ουσίας.

Η ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό της ελεγχόμενης ουσίας (συμπεριλαμβανομένων των κυριότερων προσμείξεων, εάν είναι δυνατόν) στο μέσο χορήγησης των δόσεων, καθώς επίσης και στο βιολογικό υλικό, θα πρέπει να προηγείται από την έναρξη της μελέτης.

Όλα τα στοιχεία σχετικά με την ταυτότητα, τις φυσικοχημικές ιδιότητες, την καθαρότητα και τη συμπεριφορά της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να περιλαμβάνονται στην έκθεση της δοκιμής.

Δ. ΦΡΟΝΤΙΔΑ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

Για τις δοκιμές τοξικότητας ουσιαστικός είναι ο αυστηρός έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών και οι κατάλληλες τεχνικές φροντίδας των πειραματόζωων.

i) Συνθήκες στέγασης

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες στους θαλάμους ή στα περιφράγματα θα πρέπει να είναι κατάλληλες για το κάθε είδος πειραματόζωου. Για τους επίμυες, τους ποντικούς και τα ινδικά χοιρίδια, κατάλληλες συνθήκες είναι η θερμοκρασία δωματίου 22 ± 3 °C με σχετική υγρασία 30 % έως 70 % 7 για τα κουνέλια η θερμοκρασία πρέπει να είναι 20 ± 3 °C με σχετική υγρασία 30 % έως 70 %.

Μερικές πειραματικές τεχνικές είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην επίδραση της θερμοκρασίας και, σ' αυτές τις περιπτώσεις, η περιγραφή της πειραματικής μεθόδου πρέπει να περιλαμβάνει και λεπτομέρειες για τις κατάλληλες συνθήκες. Σε όλες τις έρευνες για τις τοξικές επιδράσεις η θερμοκρασία και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται, να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση της μελέτης.

Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός και η φωτοπερίοδος να αποτελείται από δώδεκα ώρες φωτός και δώδεκα ώρες σκότους. Λεπτομέρειες για τον προγραμματισμό της φωτοπερίοδου πρέπει να καταγράφονται και να περιλαμβάνονται στην τελική έκθεση της μελέτης.

Εάν η μέθοδος δεν καθορίζει διαφορετικές συνθήκες, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε μικρές ομάδες ζώων που ιδίου φύλου. Σε περίπτωση ομαδικής στέγασης, τα κλουβιά δεν πρέπει να περιέχουν περισσότερα από πέντε ζώα.

Στις εκθέσεις πειραμάτων με ζώα, είναι σημαντικό να αναφέρεται ο τύπος των χρησιμοποιούμενων κλουβιών και ο αριθμός των ζώων ανά κλουβί, τόσο κατά την περίοδο έκθεσης στη χημική ουσία, όσο και κατά την μετέπειτα περίοδο των παρατηρήσεων.

ii) Συνθήκες διατροφής

Τα σιτηρέσια πρέπει να ανταποκρίνονται σε όλες τις διατροφικές απαιτήσεις του χρησιμοποιούμενου πειραματόζωου. Όταν οι ουσίες χορηγούνται στα ζώα μαζί με την τροφή τους, η θρεπτική αξία του σιτηρεσίου μπορεί να ελαττωθεί λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ουσίας και των συστατικών της τροφής. Η δυνατότητα μιας τέτοιας αντίδρασης πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων του πειράματος. Επιτρέπεται η χορήγηση συμβατικών εργαστηριακών σιτηρεσίων με χορήγηση απεριόριστης ποσότητας πόσιμου νερού. Η επιλογή του σιτηρεσίου μπορεί να εξαρτηθεί από την ανάγκη εξασφάλισης κατάλληλου μείγματος ελεγχόμενης ουσίας εφ' όσον αυτή χορηγείται με την εν λόγω μέθοδο. Τροφικές προσμείξεις που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν την τοξικότητα δεν πρέπει να περιέχονται στο σιτηρέσιο σε συγκεντρώσεις που θα επιτρέψουν παρεμβολή.

Ε. ΠΡΟΝΟΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΖΩΑ

Κατά την επεξεργασία των μεθόδων δοκιμής, ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην πρόνοια για τα ζώα. Μερικά παραδείγματα παρέχονται σε συντομία παρακάτω χωρίς αυτός ο κατάλογος να

είναι εξαντλητικός. Η επακριβής διατύπωση ή/και οι συνθήκες πρέπει να υπάρχουν στο κείμενο των μεθόδων:

- Για τον προσδιορισμό της οξείας τοξικότητας από το στόμα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη δύο εναλλακτικές μέθοδοι, η "τεχνική της σταθερής δόσης" και η "μέθοδος κλάσης οξείας τοξικότητας". Στην "τεχνική της σταθερής δόσης" ο θάνατος δεν αποτελεί ειδικό τελικό σημείο ελέγχου και χρησιμοποιούνται λιγότερα ζώα. Στην "μέθοδο κλάσης οξείας τοξικότητας" ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων πειραματόζωων είναι κατά μέσο όρο 70 % μικρότερος εκείνου της μεθόδου B.1 για την οξεία τοξικότητα από το στόμα. Και οι δύο εναλλακτικές μέθοδοι προκαλούν λιγότερο πόνο και δυσφορία απ' ό,τι η κλασική μεθοδολογία.

- Ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων ζώων μειώνεται στο ελάχιστο επιστημονικά αποδεκτό: στις μεθόδους B.1 και B.3 γίνεται έλεγχος σε πέντε μόνο ζώα του ίδιου φύλου ανά επίπεδο δόσης 7 για τον προσδιορισμό της ευαισθητοποίησης του δέρματος χρησιμοποιούνται μόνο δέκα ζώα (και μόνο πέντε για την ομάδα μάρτυρα αρνητικού αποτελέσματος) στη δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (μέθοδος B.6) 7 επίσης μειώνεται ο αριθμός των ζώων που χρειάζονται ως θετικοί μάρτυρες στη δοκιμή της μεταλλαξιγένεσης in vivo (μέθοδοι B.11 και B.12).

- Κατά τη διάρκεια των δοκιμών ελαχιστοποιείται ο πόνος και η δυσφορία των ζώων: ζώα που παρουσιάζουν έντονες και παρατεταμένες ενδείξεις δυσφορίας και πόνου μπορεί να θανατωθούν με ανώδυνο τρόπο 7 η χορήγηση πειραματικών ουσιών κατά τρόπο που είναι γνωστό ότι προκαλεί έντονο πόνο και δυσφορία λόγω διαβρωτικών ή ερεθιστικών ιδιοτήτων (μέθοδοι B.1, B.2 και B.3) είναι περιττή.

- Ο πειραματισμός με υπερβολικά υψηλές δόσεις αποφεύγεται με την εισαγωγή οριακών δοκιμών, όχι μόνο στις δοκιμές οξείας τοξικότητας (μέθοδοι B.1, B.2 και B.3), αλλά και στις δοκιμές in vivo για μεταλλαξιγένεση (μέθοδοι B.11 και B.12).

- Μια στρατηγική ελέγχου για την ερεθιστικότητα επιτρέπει τώρα τη μη εκτέλεση ενός πειράματος ή τον περιορισμό του σε απλή μελέτη ενός μόνου ζώου, εφόσον μπορούν να παρασχεθούν επαρκείς επιστημονικές αποδείξεις.

Οι επιστημονικές αυτές αποδείξεις μπορούν να βασίζονται στις φυσικοχημικές ιδιότητες της ουσίας, στα αποτελέσματα άλλων δοκιμών που έχουν ήδη πραγματοποιηθεί ή στα αποτελέσματα έγκυρων δοκιμών in vitro. Για παράδειγμα, αν με την ουσία έχει διενεργηθεί μελέτη οξείας τοξικότητας δια της δερματικής οδού με δόση της οριακής δοκιμής (μέθοδος B.3) και δεν έχει παρατηρηθεί κανένας ερεθισμός του δέρματος, μπορεί να μη χρειάζεται περαιτέρω δοκιμή ως προς το δερματικό ερεθισμό (μέθοδος B.4) 7 προϊόντα για τα οποία έχει διαπιστωθεί σαφής διαβρωτική ή σοβαρή δερματική ερεθιστικότητα, κατά τη μελέτη του δερματικού ερεθισμού (μέθοδος B.4) δεν θα πρέπει να υποβάλλονται σε περαιτέρω δοκιμή ως προς την ικανότητα ερεθισμού στα μάτια (μέθοδος B.5)

ΣΤ. ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

Ένας από τους επιστημονικούς στόχους της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι η ανάπτυξη και η αξιολόγηση της εγκυρότητας εναλλακτικών τεχνικών που μπορούν να παρέχουν πληροφορίες του ίδιου επιπέδου με εκείνες που λαμβάνονται από τις τρέχουσες δοκιμές σε ζώα, χρησιμοποιώντας όμως μικρότερο αριθμό πειραματόζωων και προκαλώντας λιγότερη ταλαιπωρία ή αποφεύγοντας τελείως τη χρήση πειραματόζωων.

Τέτοιες μέθοδοι, εφόσον διατίθενται, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν είναι δυνατόν για τον χαρακτηρισμό του κινδύνου και την επακόλουθη ταξινόμηση και επισήμανση σε σχέση με τους εγγενείς κινδύνους.

Ζ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Κατά την αξιολόγηση και ερμηνεία των δοκιμών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι περιορισμοί στο βαθμό απ' ευθείας προέκτασης στον άνθρωπο των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τις δοκιμές in vitro σε ζώα και, εφ' όσον διατίθενται στοιχεία για δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο, μπορεί να χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των δοκιμών. Τα εν λόγω αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταξινόμηση και επισήμανση των νέων και των υπαρχουσών χημικών ουσιών όσον αφορά την επίδρασή τους στην υγεία του

ανθρώπου, με βάση τις εγγενείς ιδιότητές τους που έχουν διαπιστωθεί και προσδιορίζεται ποσοτικά με τη βοήθεια των μεθόδων αυτών. Τα αντίστοιχα κριτήρια του παραρτήματος VI για την ταξινόμηση και επισήμανση αφορούν επίσης τα τελικά σημεία ελέγχου των πρωτοκόλλων των δοκιμών που περιλαμβάνονται στις προαναφερόμενες μεθόδους δοκιμών.

Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στις μελέτες εκτίμησης του κινδύνου νέων και υπαρχουσών χημικών ουσιών. Οι κατάλληλες για το σκοπό αυτό στρατηγικές δοκιμών παρέχονται στα αντίστοιχα καθοδηγητικά έγγραφα.

Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Οι περισσότερες από τις μεθόδους αυτές έχουν αναπτυχθεί στο πλαίσιο του προγράμματος του ΟΟΣΑ για τις κατευθυντήριες γραμμές δοκιμών και πρέπει να εφαρμόζονται σύμφωνα με τις αρχές ορθής εργαστηριακής πρακτικής ώστε να εξασφαλίζεται η ευρύτερη δυνατή "αμοιβαία αποδοχή των δεδομένων".

Περαιτέρω πληροφορίες μπορούν να αναζητηθούν στις παραπομπές των κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ καθώς και στην αλλού δημοσιευμένη σχετική βιβλιογραφία.

B. 1. β

ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ) - ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΛΑΣΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Η μέθοδος κλάσης οξείας τοξικότητας παρέχει πληροφορίες για τους σκοπούς της εκτίμησης και της ταξινόμησης του κινδύνου.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί τρεις σοβαρές δόσεις επαρκώς διαχωρισμένες μεταξύ τους ώστε να επιτρέπουν την κατάταξη της ουσίας βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης. Πέραν τούτου, η περιγραφόμενη στη μέθοδο αυτή διαδικασία παρέχει τη δυνατότητα επιλογής τριών πρόσθετων σταθερών δόσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως εναλλακτικές επιλογές σε δεδομένα αποφασιστικά σημεία είτε για περαιτέρω δοκιμές. Σε περίπτωση που επιθυμείται ή απαιτείται περαιτέρω εμβάθυνση μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε από τις πρόσθετες αυτές δόσεις.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί καθορισμένες εναρκτήριες δόσεις και δεν έχει ως σκοπό τον υπολογισμό ακριβούς LD₅₀ αλλά τον προσδιορισμό ενός φάσματος τιμών έκθεσης δυνάμεων να προκαλέσουν θνησιμότητα, καθόσον ως βασικό τελικό σημείο ελέγχου της δοκιμής αυτής παραμένει ο θάνατος ενός ποσοστού των πειραματοζώων. Τα αποτελέσματα της δοκιμής πρέπει να επιτρέψουν την ταξινόμηση της ελεγχόμενης ουσίας βάσει των κριτηρίων του παραρτήματος VI. Δεδομένου ότι πρόκειται για μια κλιμακωτή προσέγγιση, η διάρκεια της δοκιμής μπορεί να είναι μεγαλύτερη από εκείνη της μεθόδου B.1. Το κυριότερο πλεονέκτημα της παρούσας μεθόδου είναι ότι απαιτεί μικρότερο αριθμό πειραματοζώων σε σχέση με τη μέθοδο της οξείας τοξικότητας (από το στόμα) (B.1) και με την εναλλακτική μέθοδο της σταθερής δόσης (B.1a).

Βλ. επίσης γενική εισαγωγή, μέρος B.

1.2. Ορισμοί

Βλ. γενική εισαγωγή, μέρος B.

1.3. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Μία από τις καθορισμένες δόσεις της ουσίας χορηγείται από το στόμα σε ομάδα πειραματοζώων. Εφαρμόζεται σταδιακή διαδικασία χρησιμοποιώντας τρία ζώα του ίδιου φύλου σε κάθε στάδιο. Δεν απαιτείται προκαταρκτική μελέτη παρατήρησης. Η απουσία ή παρουσία συνδεδεμένης με την ουσία θνησιμότητας στα ζώα μετά τη χορήγηση δόσης σε ένα στάδιο, θα καθορίσει το επόμενο στάδιο δηλ. εάν:

- δεν απαιτείται περαιτέρω δοκιμή
- στο επόμενο στάδιο θα χορηγηθεί η ίδια δόση αλλά σε ζώα του άλλου φύλου
- στο επόμενο στάδιο θα χορηγηθεί το αμέσως υψηλότερο ή το αμέσως χαμηλότερο επίπεδο δόσης.

1.4. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.4.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα επιλέγονται τυχαία, σηματοδοτούνται για να μπορούν να αναγνωριστούν και στεγάζονται σε κλουδιά επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου. Τα ζώα είναι δυνατόν να στεγάζονται ομαδικά κατά φύλο και κατά δόση, αλλά ο αριθμός των ζώων σε κάθε κλουδί πρέπει να επιτρέπει την άνετη παρατήρηση κάθε ζώου.

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται στα ζώα σε εφάπαξ δόση με αναγκαστική θρέψη χρησιμοποιώντας καθετήρα στομάχου ή κατάλληλη διασωλήνωση.

Εάν είναι αναγκαίο, χρησιμοποιείται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Όπου είναι δυνατόν, προτιμάται, η χρήση υδατικού διαλύματος/αιωρήματος, ακολούθως η χρήση διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τέλος η διάλυση σε άλλους φορείς. Για μη υδατικούς φορείς, τα τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά ή να προσδιορίζονται πριν από τη δοκιμή.

Τα ζώα πρέπει να υποβάλλονται σε νηστεία πριν από τη χορήγηση της δόσης (π.χ. μία νύχτα για τον επίμυ ή 3 - 4 ώρες για τον ποντικό) η χορήγηση νερού δεν απαγορεύεται.

- 1.4.2. *Συνθήκες δοκιμής*
- 1.4.2.1. Πειραματόζωα
- Εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, ο επίμυς είναι το προτιμώτερο είδος τρωκτικού. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα.
- Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους για κάθε φύλο.
- 1.4.2.2. Αριθμός και φύλο
- Για κάθε στάδιο χρησιμοποιούνται τρία ζώα του ίδιου φύλου. Στο πρώτο στάδιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε αρσενικά είτε θηλυκά ζώα.
- 1.4.2.3. Επίπεδα δόσεων
- Το επίπεδο δόσης που θα χρησιμοποιηθεί ως εναρκτήρια δόση επιλέγεται μεταξύ των τριών καθορισμένων επιπέδων ήτοι 25, 200 και 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Το επίπεδο της εναρκτήριας δόσης πρέπει να είναι εκείνο που έχει τις μεγαλύτερες πιθανότητες να προκαλέσει θνησιμότητα σε ορισμένα τουλάχιστον από τα ζώα στα οποία θα χορηγηθεί. Ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη εναρκτήρια δόση μπορεί να ακολουθηθεί ένα από τα διαγράμματα ροής των διαδικασιών που περιγράφονται στο παράρτημα 1.
- Για την επιλογή του φύλου και της εναρκτήριας δόσης πρέπει να χρησιμοποιηθούν όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αφορούν τις σχέσεις δομής-δράσης. Όταν από τις πληροφορίες αυτές προκύπτει ότι το υψηλότερο επίπεδο δόσης (2 000 mg/kg βάρους σώματος) δεν είναι πιθανόν να προκαλέσει θνησιμότητα, απαιτείται διεξαγωγή οριακής δοκιμής. Εάν δεν διατίθενται πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη ουσία συνιστάται, για τη μη ταλαιπώρηση των ζώων, η χρησιμοποίηση εναρκτήριας δόσης 200 mg/kg βάρους σώματος.
- Ορισμένες φορές είναι δυνατόν να απαιτούνται ακριβέστερες πληροφορίες από εκείνες που παρέχει η δοκιμή με τα τρία επίπεδα σταθερής δόσης των 25, 200 και 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο διαξαγωγής περαιτέρω δοκιμών με τα επίπεδα σταθερής δόσης των 5, 50 ή 500 mg/kg βάρους σώματος.
- Δόσεις που είναι γνωστό ότι προκαλούν έκδηλο πόνο και ταλαιπωρία λόγω της διαβρωτικής ή εξαιρετικά ερεθιστικής τους δράσης δεν είναι αναγκαίο να χορηγούνται.
- Το χρονικό διάστημα μεταξύ των διεξαγομένων στις διάφορες ομάδες δοκιμών καθορίζεται από το χρόνο εμφανίσεως, τη διάρκεια και τη σοβαρότητα των τοξικών εκδηλώσεων. Η αγωγή σε ζώα του άλλου φύλου ή στο επόμενο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να αρχίσει προτού επιβεβαιωθεί ότι τα ζώα της προηγούμενης δοκιμής έχουν επιδώσει.
- 1.4.2.4. Οριακή δοκιμή
- Μπορεί να διεξαχθεί οριακή δοκιμή με επίπεδο δόσης 2 000 mg/kg βάρους σώματος σε τρία ζώα από κάθε φύλο. Εάν παρατηρηθεί θνησιμότητα οφειλόμενη στην ελεγχόμενη ουσία ενδέχεται να απαιτηθεί περαιτέρω δοκιμή με 200 mg/kg (ή 500 mg/kg) βάρους σώματος.
- 1.4.2.5. Περίοδος παρατήρησης
- Η παρατήρηση των ζώων διαρκεί κανονικά 14 ημέρες εκτός εάν απαιτηθεί απομάκρυνση ορισμένων ζώων προκειμένου να θανατωθούν με ανώδυνο τρόπο για να μην ταλαιπωρούνται ή αν έχουν βρεθεί νεκρά ζώα. Ωστόσο, η διάρκεια της παρατήρησης δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη, αλλά να προσδιορίζεται με βάση τις τοξικές αντιδράσεις, το χρόνο εμφάνισης και τη διάρκεια της περιόδου ανάρρωσης και να παρατείνεται εάν θεωρείται αναγκαίο. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφανίσεως των τοξικών εκδηλώσεων είναι σημαντικός, ιδίως εάν παρατηρείται τάση καθυστερημένης εμφάνισης τοξικών συμπτωμάτων. Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά και χωριστά για κάθε ζώο.
- 1.4.3. *Διαδικασία*
- Μετά την περίοδο της νηστείας τα ζώα ζυγίζονται πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας. Μετά τη χορήγηση της ουσίας δεν πρέπει να παρέχεται τροφή για άλλες 3 - 4 ώρες. Όταν μια δόση χορηγείται τμηματικά μέσα σε μια χρονική περίοδο, ενδέχεται να απαιτηθεί παροχή τροφής και νερού στα ζώα, ανάλογα με τη διάρκεια της χρονικής αυτής περιόδου.
- Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Για τα πρακτικά, ο όγκος αυτός δεν πρέπει να υπερβαίνει κανονικά το 1 ml/100 g βάρους σώματος. Εάν πρόκειται όμως για υδατικά διαλύματα ο όγκος μπορεί να ανέλθει σε 2 ml/100 g βάρους σώματος. Οι διαφορές του όγκου πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση κατά τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Αν η χορήγηση μιας μόνο δόσης δεν είναι δυνατή, η δόση μπορεί να χορηγηθεί σε μικρότερα κλάσματα σε χρονικό διάστημα που δεν υπερβαίνει τις 24 ώρες.
- Η διαδικασία δοκιμής περιγράφεται λεπτομερώς στο παράρτημα 1.

1.4.3.1. Γενικές παρατηρήσεις

Τα ζώα υποβάλλονται σε προσεκτική κλινική παρατήρηση τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα της χορήγησης της ουσίας ή συχνότερα εάν είναι αναγκαίο λόγω της απόκρισης του ζώου στην αγωγή, και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά ημερησίως. Ζώα ετοιμοθάνατα ή που παρουσιάζουν έντονο πόνο και επίμονη σοβαρή δυσφορία πρέπει να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο. Τα ζώα που θανατώθηκαν προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν συνεκτιμώνται με εκείνα που πέθαναν κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής ζώα.

Ο χρόνος θανάτου των ζώων που έχουν θανατωθεί προκειμένου να μην ταλαιπωρηθούν ή που έχουν θρεθεί νεκρά καταγράφεται με την μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια. Πρόσθετες παρατηρήσεις απαιτούνται εάν τα ζώα συνεχίζουν να παρουσιάζουν τοξικές εκδηλώσεις. Οι παρατηρήσεις πρέπει να αφορούν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στα μάτια και στους βλεννογόνους καθώς και στο αναπνευστικό, το κυκλοφοριακό, το αυτόνομο και το κεντρικό νευρικό σύστημα, στην σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στην παρατήρηση τρόμου, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κόματος.

Όλες οι παρατηρήσεις καταγράφονται συστηματικά και χωριστά για κάθε ζώο.

1.4.3.2. Βάρος σώματος

Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται λίγο πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Οι μεταβολές του βάρους πρέπει να υπολογίζονται και να καταγράφονται. Στο τέλος της δοκιμής τα ζώα που έχουν επιβιώσει ζυγίζονται προτού θανατωθούν με ανώδυνο τρόπο.

1.4.3.3. Νεκροψία

Όλα τα πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένων των θανόντων κατά τη διάρκεια της δοκιμής και εκείνων που αποσύρθηκαν από τη μελέτη, υποβάλλονται σε ολική νεκροψία. Όλες οι μακροσκοπικές παθολογοανατομικές μεταβολές πρέπει να καταγράφονται για κάθε ζώο ξεχωριστά. Μια μικροσκοπική εξέταση των οργάνων που εμφανίζουν μακροσκοπικές παθολογοανατομικές μεταβολές είναι δυνατόν να προβλεφθεί για τα ζώα που έχουν επιβιώσει 24 ώρες τουλάχιστον, δεδομένου ότι από την εξέταση αυτή μπορούν να προκύψουν χρήσιμες πληροφορίες.

2. ΔΕΛΟΜΕΝΑ

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο ξεχωριστά. Επίσης, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει για κάθε ομάδα τον αριθμό των χρησιμοποιηθέντων ζώων, τον αριθμό των ζώων που εμφανίζουν τοξικές εκδηλώσεις, τον αριθμό των ζώων που θρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή που θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, το χρόνο θανάτου κάθε ζώου, περιγραφή και χρονική πορεία των τοξικών εκδηλώσεων, αναστρεψιμότητα και ευρήματα νεκροψίας.

Γενικές οδηγίες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων με σκοπό την ταξινόμηση παρέχονται στο παράρτημα 2.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει, εφ' όσον είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

Για τα πειραματόζωα:

- είδος/φυλή,
- μικροβιολογική κατάσταση των ζώων, εάν είναι γνωστή,
- αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,
- προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφής, κ.λπ.,
- βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής, στη συνέχεια κατά εβδομαδιαία διαστήματα και στο τέλος της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό,
- λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας συμπεριλαμβανομένων των όγκων των δόσεων και του χρόνου χορηγήσεώς τους,
- λεπτομερή στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού (συμπεριλαμβανομένου του είδους και της πηγής της τροφής και της πηγής του νερού),
- αιτιολόγηση της επιλογής της εναρκτήριας δόσης.

Για τα αποτελέσματα:

- κατάρτιση πίνακα με τα αποτελέσματα κατά φύλο και επίπεδο δόσης για καθένα από τα ζώα (δηλ. αριθμός ζώων που παρουσίασαν εκδηλώσεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, της φύσης, της σοβαρότητας και της διάρκειας των συμπτωμάτων),
- χρόνος εμφάνισης των εκδηλώσεων τοξικότητας και εάν αυτές ήταν αναστρέψιμες για καθένα από τα ζώα,
- ευρήματα νεκροψίας και τυχόν ιστοπαθολογικά ευρήματα για καθένα από τα ζώα, εφ' όσον διατίθενται.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

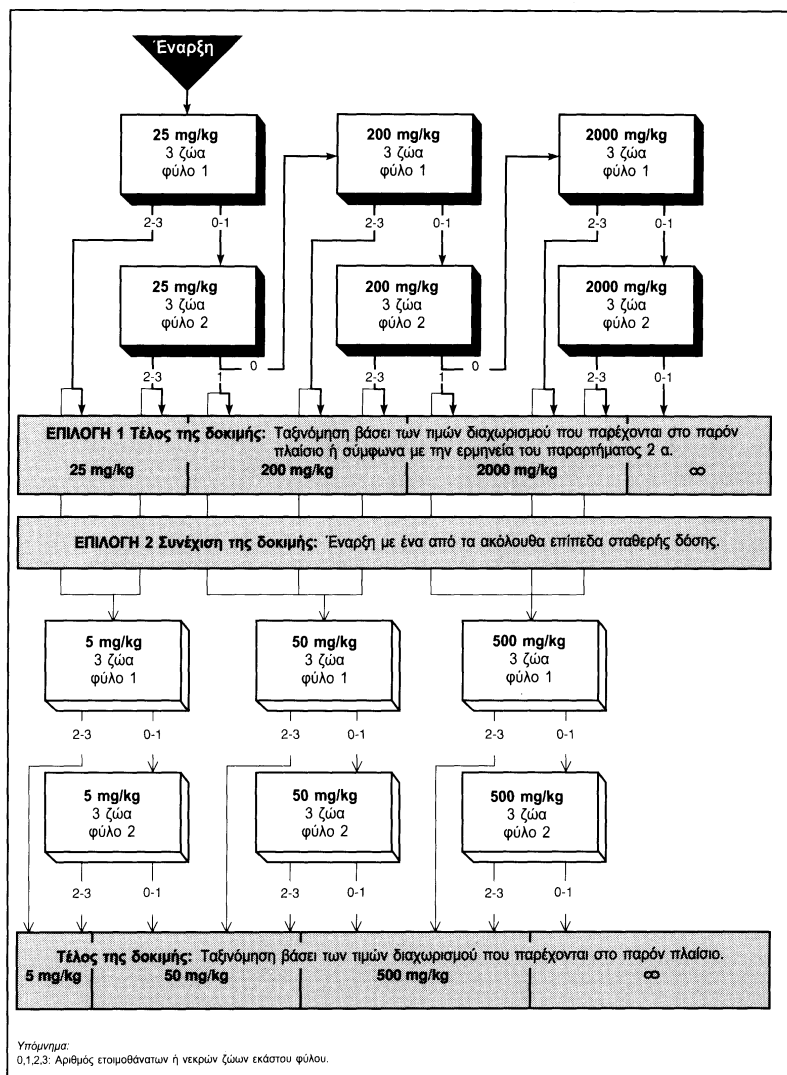
Η παρούσα μέθοδος είναι παραλήσια της TG 423 του ΟΟΣΑ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

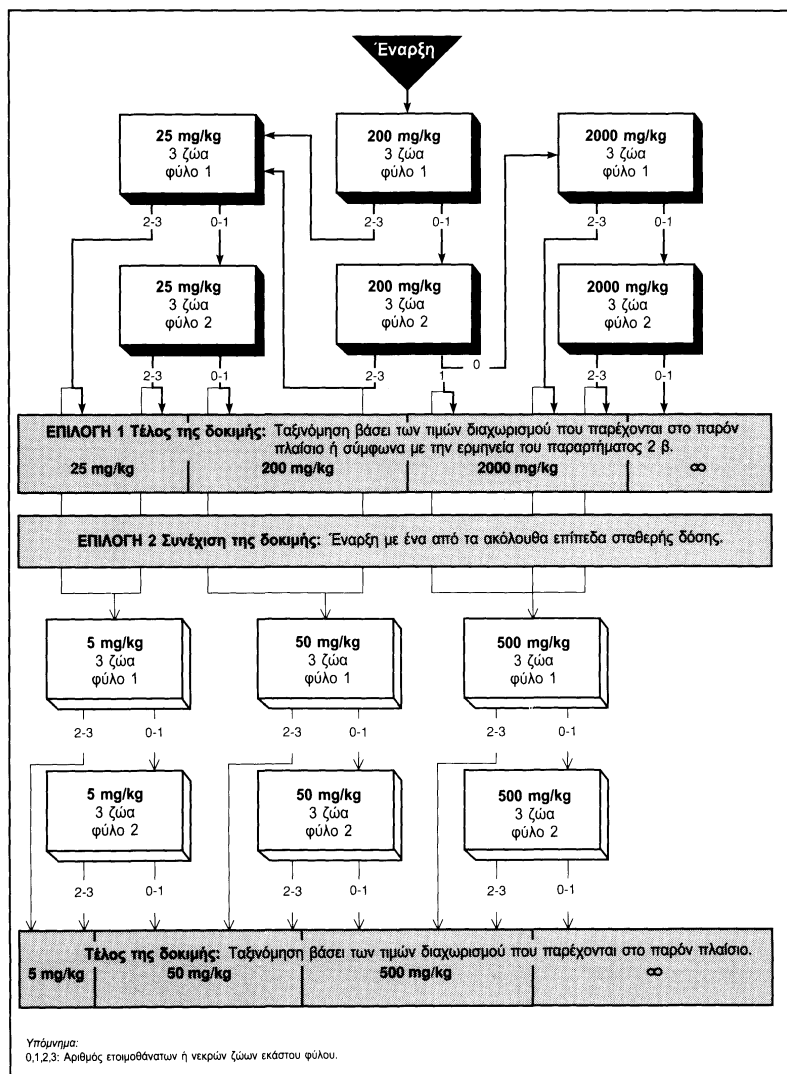
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ

1. Όπως αναφέρεται στο σημείο 1.4.2.3, ως εναρκτήρια δόση λαμβάνεται η δόση που είναι πιθανό να προκαλέσει θνησιμότητα σε ορισμένα τουλάχιστον από τα ζώα στα οποία χορηγείται. Για την επιλογή της εναρκτήριας δόσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν πληροφορίες όπως:
 - στοιχεία για τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της ουσίας,
 - η σχέση δομής-δράσης,
 - δεδομένα από άλλες τοξικολογικές δοκιμές και,
 - η προβλεπόμενη χρήση της ελεγχόμενης ουσίας.
2. Η ακολουθητέα διαδικασία για καθένα από τις εναρκτήριες δόσεις περιγράφεται σχηματικά στα αντίστοιχα διαγράμματα δοκιμής του παρόντος παραρτήματος. Ανάλογα με τον αριθμό των θανατωθέντων με ανώδυνο τρόπο ή νεκρών ζώων η διαδικασία δοκιμής ακολουθεί την πορεία που δείχνουν τα αντίστοιχα βέλη.
3. Κανονικά, όταν εναρκτήρια δόση των 25 ή 200 mg/kg βάρους σώματος προκαλεί το θάνατο ενός μόνο ζώου του δεύτερου φύλου, δεν απαιτείται συνέχιση της δοκιμής. Ωστόσο, εάν δεν παρατηρηθεί καμία τοξική εκδήλωση στα άλλα πέντε πειραματόζωα, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο κατά την αυτοψία μήπως η θνησιμότητα δεν σχετίζεται με την ουσία. Στην περίπτωση αυτή, η δοκιμή πρέπει να συνεχιστεί με το αμέσως υψηλότερο επίπεδο δόσης.
4. Όταν η χορήγηση δόσης 2 000 mg/kg βάρους σώματος προκαλεί θάνατο σε ένα ζώο από κάθε φύλο, η τιμή LD₅₀ αναμένεται να υπερβαίνει τα 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Επειδή όμως πρόκειται για οριακό αποτέλεσμα, πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά και η απόκριση των τεσσάρων άλλων ζώων (δύο από κάθε φύλο). Η εμφάνιση σαφών, έντονων τοξικών εκδηλώσεων στα ζώα αυτά μπορεί να οδηγήσει σε ταξινόμηση αντίστοιχη προς τιμή LD₅₀ 2 000 mg/kg βάρους σώματος ή μικρότερη, ή να δικαιολογήσει τη συνέχιση των δοκιμών με το ίδιο επίπεδο δόσης.
5. Η διαδικασία επιτρέπει επίσης τη διεξαγωγή δοκιμών με τρεις πρόσθετες σταθερές δόσεις (επιλογή 2). Στο πλαίσιο της δεύτερης αυτής επιλογής μπορεί είτε να κριθεί σκόπιμη η χρησιμοποίηση εναλλακτικής δόσης σ' ένα δεδομένο αποφασιστικό σημείο, είτε να αποφασιστεί η διεξαγωγή περαιτέρω δοκιμών μετά την ολοκλήρωση της τρέχουσας δοκιμής (επιλογή 1). Η διαδικασία δοκιμής, επιλογή 1, επισημαίνεται με έντονα βέλη ενώ για την επιλογή 2 χρησιμοποιούνται βέλη κανονικού πάχους.

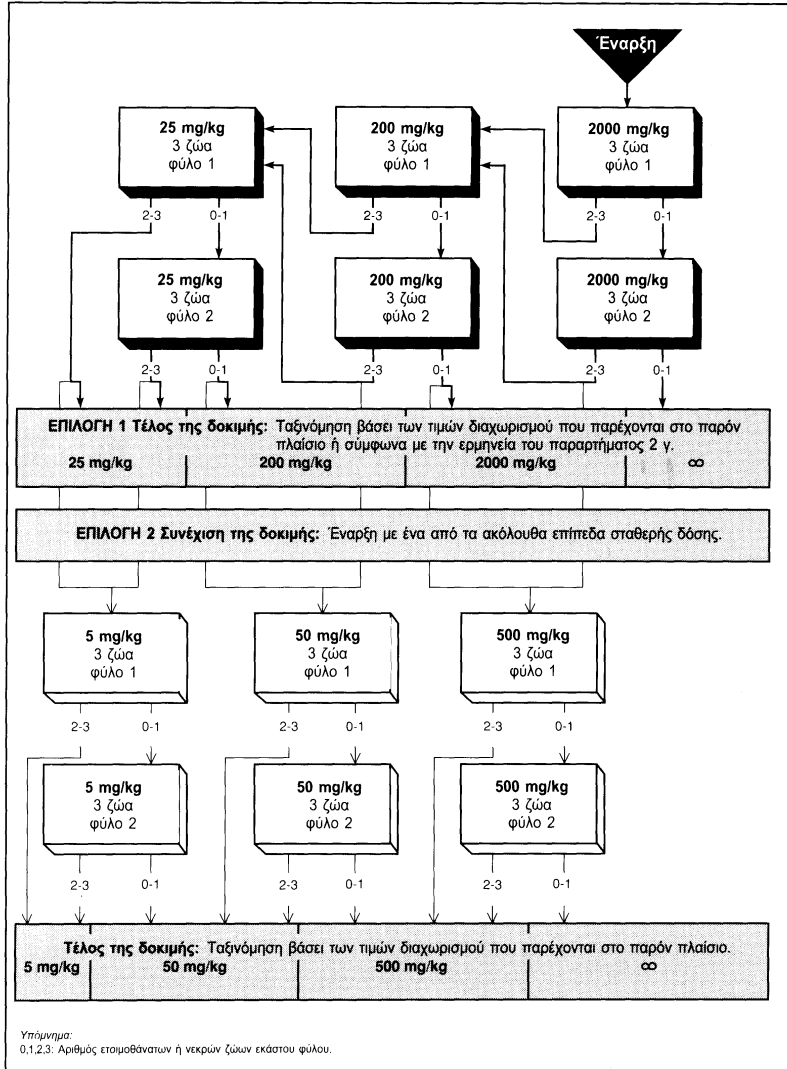
α) Διαδικασία δοκιμής με εναρκτήρια δόση 25 mg/kg βάρους σώματος



6) Διαδικασία δοκιμής με εναρκτήρια δόση 200 mg/kg δάρους σώματος



γ) Διαδικασία δοκιμής με εναρκτήρια δόση 2000 mg/kg βάρους σώματος



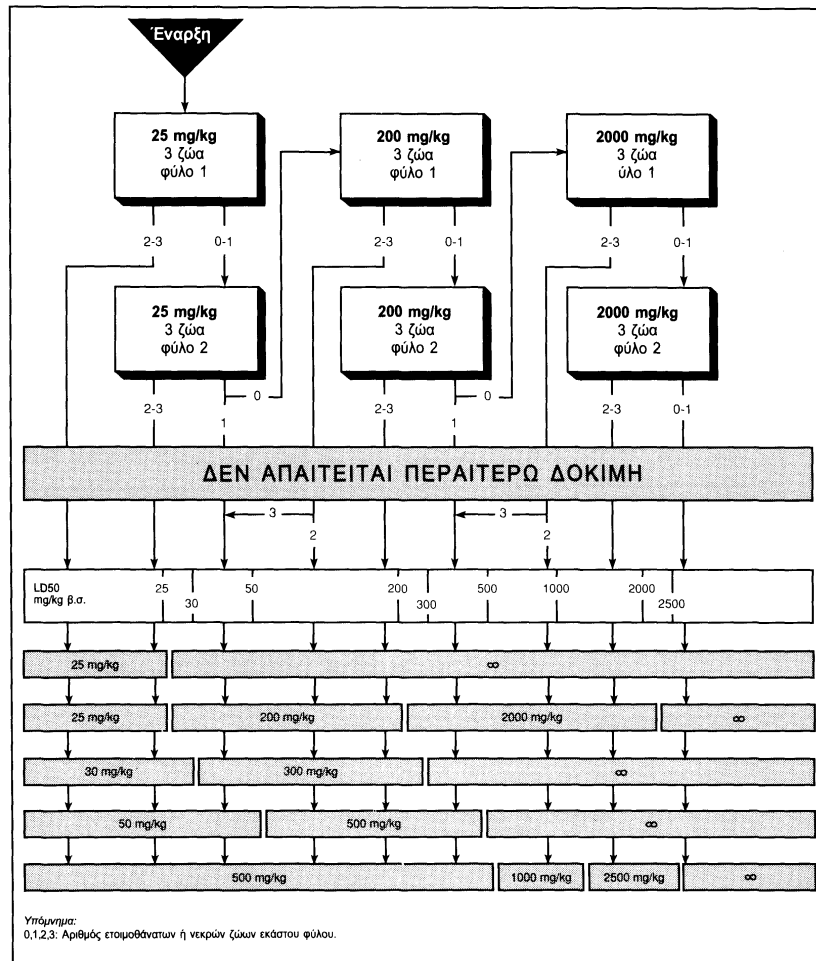
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ ΕΠΙΛΟΓΗ 1

Στα διαγράμματα του παρόντος παραρτήματος, τα σκιασμένα πλαίσια που βρίσκονται κάτω από το πλαίσιο με την ένδειξη «Δεν απαιτείται περαιτέρω δοκιμή», περιλαμβάνουν τιμές διαχωρισμού για την ταξινόμηση. Ανάλογα με τη διαδικασία δοκιμής που περιγράφεται για την επιλογή 1, πρέπει να ακολουθείται το κατάλληλο δέλος προς τα κάτω μέχρι το αντίστοιχο σκιασμένο πλαίσιο.

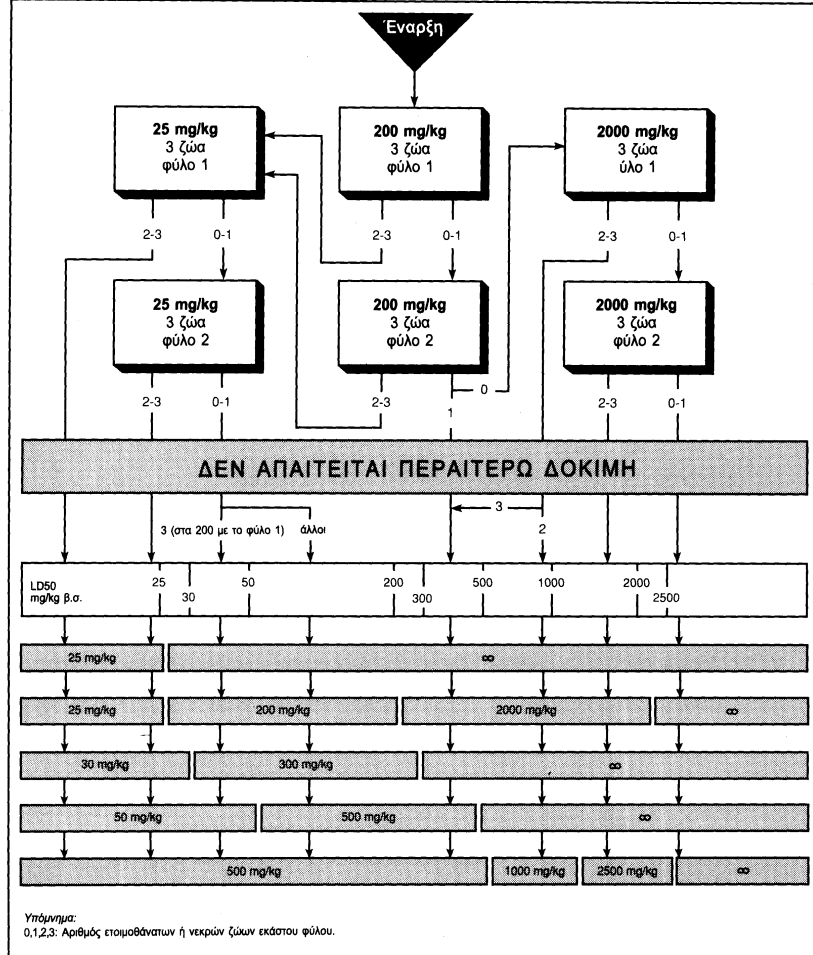
α) Ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση τη δοκιμή επιλογή 1

Εναρκτήρια δόση: 25 mg/kg βάρους σώματος



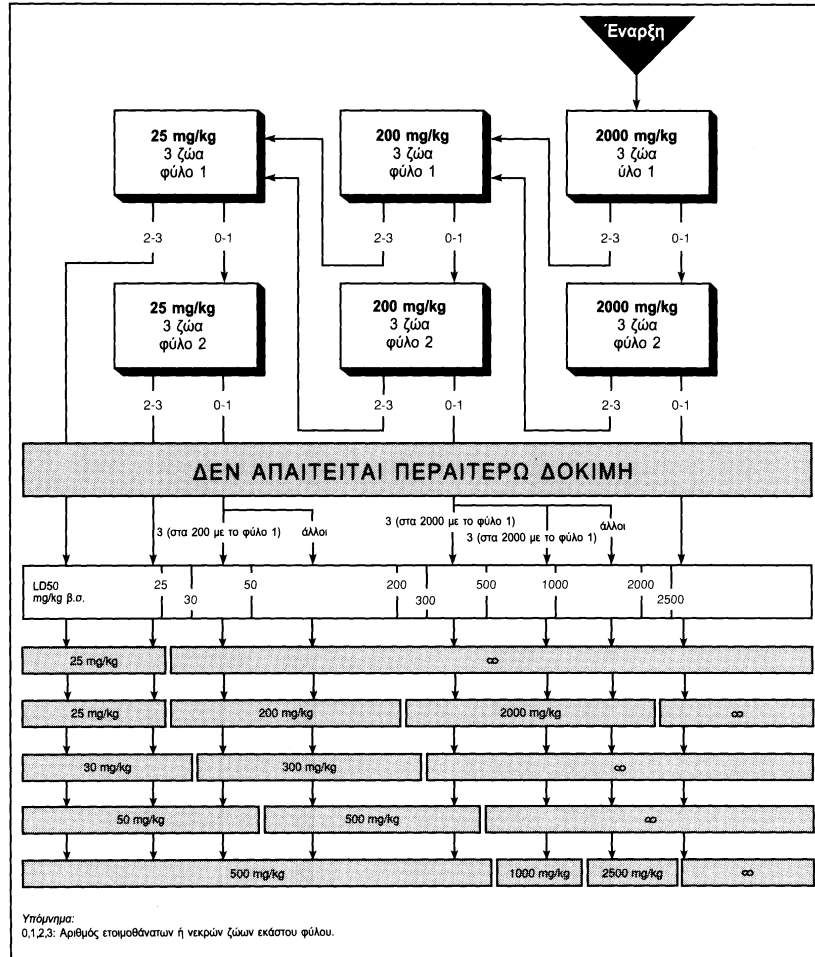
6) Ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση τη δοκιμή επιλογή 1

Εναρκτήρια δόση: 200 mg/kg βάρους σώματος



γ) Ερμηνεία των αποτελεσμάτων με βάση τη δοκιμή επιλογή 1

Εναρκτήρια δόση: 2 000 mg/kg δάρους σώματος



B.2. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι χρήσιμο να έχουμε προκαταρκτικές πληροφορίες για την κατανομή του μεγέθους σωματιδίων, την τάση ατμών, το σημείο τήξεως, το σημείο ζέσεως, το σημείο αναφλέξεως και την εκκρηκτικότητα (αν υπάρχει) της ουσίας.

Βλέπε επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Διάφορες ομάδες πειραματοζώων εκτίθενται για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης ουσίας, χρησιμοποιούμενης μιας μόνο συγκεντρώσεως ανά ομάδα. Στη συνέχεια γίνονται παρατηρήσεις για τοξικές επιδράσεις και θανάτους. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας νεκροτομούνται, καθώς και εκείνα που επιζούν στο τέλος της δοκιμασίας.

Τα ζώα που εμφανίζουν έντονα και διαρκή σημεία δυσφορίας και πόνου μπορεί να χρειάζεται να θανατωθούν ανώδυνα. Δεν χρειάζεται να γίνεται χορήγηση των εξεταζόμενων ουσιών με τρόπο ο οποίος είναι γνωστό ότι προκαλεί έντονο πόνο και δυσφορία λόγω διαβρωτικών ή ιδιαίτερα ερεθιστικών ιδιοτήτων.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.6.1. Προετοιμασίες

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής τουλάχιστον για 5 ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή υγιή, νεαρά ζώα και κατανέμονται στον απαιτούμενο αριθμό ομάδων. Τα ζώα δεν είναι ανάγκη να υφίστανται παρόμοιες εκθέσεις, εκτός εάν αυτό ενδείκνυται από τον τύπο της χρησιμοποιούμενης συσκευής εκθέσεως.

Οι στερεές εξεταζόμενες ουσίες μπορεί να χρειάζονται κονιοποίηση προκειμένου να ληφθούν σωματίδια ενός κατάλληλου μεγέθους.

Εφ' όσον κριθεί αναγκαίο μπορεί να προστεθεί, ένας κατάλληλος φορέας για να βοηθήσει την

παραγωγή κατάλληλης συγκεντρώσεως στην ατμόσφαιρα. αυτή την περίπτωση, πρέπει να χρησιμοποιηθεί και μία ομάδα μάρτυρα με το φορέα. Αν φορέας ή άλλες προσθετικές ουσίες χρησιμοποιούνται για να διευκολύνουν τη χορήγηση, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Ιστορικά στοιχεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν, εάν είναι κατάλληλα.

1.6.2. Συνθήκες δοκιμής

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, ο επίμυς είναι το προτιμώμενο είδος. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές. Για κάθε φύλο, το εύρος της διακύμανσης βαρών των ζώων στην αρχή της δοκιμής δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της κατάλληλης μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεως χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 τρωκτικά (πέντε θηλυκά και πέντε αρσενικά). Τα θηλυκά θα πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Σημείωση: Σε δοκιμές οξείας τοξικότητας με ζώα υψηλότερης τάξης από την τάξη των τρωκτικών, θα πρέπει να εξετάζεται η ενδεχόμενη χρησιμοποίηση μικρότερου αριθμού ζώων. Οι δόσεις θα πρέπει να επιλέγονται με προσοχή ενώ θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε να μη γίνεται υπέρβαση μετρίως τοξικών δόσεων. Στις δοκιμές αυτές, θα πρέπει να αποφεύγεται η χορήγηση θανατηφόρων δόσεων της εξεταζόμενης ουσίας.

1.6.2.3. Συγκεντρώσεις εκθέσεως

Οι συγκεντρώσεις εκθέσεως θα πρέπει να είναι επαρκείς ως προς τον αριθμό, τουλάχιστον τρεις, και να απέχουν μεταξύ τους αρκετά ώστε να παρέχουν ομάδες πειραματισμού με εύρος τοξικών επιδράσεων και ποσοστών θνησιμότητας. Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι αρκετά για τη χάραξη καμπύλης συγκεντρώσεως/θνησιμότητας και, όπου είναι δυνατό, να επιτρέπουν ένα αποδεκτό προσδιορισμό της LC50.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμασία

Εάν η έκθεση πέντε αρσενικών και πέντε θηλυκών πειραματοζώων σε 20mg/l αερίου ή 5 mg/l αερολύματος ή σωματιδίων για τέσσερις ώρες (ή, όταν αυτό δεν είναι δυνατό λόγω των φυσικών ή χημικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένης της εκρηκτικότητας της ελεγχόμενης ουσίας, στη μέγιστη εφικτή συγκέντρωση, δεν προκαλεί θνησιμότητα σχετιζόμενη με την ουσία, μέσα σε 14 ημέρες, τότε η περαιτέρω μελέτη μπορεί να θεωρείται απαραίτητη.

1.6.2.5. Χρόνος εκθέσεως

Το χρονικό διάστημα εκθέσεως θα πρέπει να είναι τέσσερις ώρες.

1.6.2.6. Συσκευές

Η δοκιμή στα ζώα πρέπει να γίνεται με αναπνευστικές συσκευές, σχεδιασμένες να διατηρούν μια δυναμική ροή του αέρα τουλάχιστον 12 αλλαγών την ώρα, να εξασφαλίζουν επάρκεια οξυγόνου

και μία ομοιομορφία κατανομής της ατμόσφαιρας εκθέσεως. Όταν χρησιμοποιείται θάλαμος, το σχήμα του πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να μειώνεται στο ελάχιστο ο συνωστισμός των πειραματοζώων και να αυξάνεται όσο το δυνατό περισσότερο η αναπνευστική τους έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία. Γενικά, για να εξασφαλίζεται σταθερότητα στην ατμόσφαιρα ενός θαλάμου, ο ολικός όγκος των πειραματοζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5 % του όγκου του πειραματικού θαλάμου. Μπορεί να χρησιμοποιείται στοματορρινικός, κεφαλικός ή ολοκλήρου του σώματος ατομικός θάλαμος εκθέσεως. Οι δύο πρώτοι συντελούν στην ελαχιστοποίηση της λήσεως ελεγχόμενης ουσίας από άλλες οδούς.

1.6.2.7. Περίοδος παρατηρήσεως

Η περίοδος παρατηρήσεων πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 ημέρες. Εντούτοις, η διάρκεια των παρατηρήσεων δεν θα πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Θα πρέπει να προσδιορίζεται από τις τοξικές αντιδράσεις, την τάξη εμφανίσεώς τους και τη διάρκεια της περιόδου αναρρώσεως. Έτσι, μπορεί να επεκταθεί αν θεωρηθεί αναγκαίο. Ο χρόνος κατά τον οποίο εμφανίζονται και εξαφανίζονται τα συμπτώματα τοξικότητας και ο χρόνος θανάτου είναι σημαντικός, ιδίως αν υπάρχει τάση για αργοπορημένους θανάτους.

1.6.3. Διαδικασία

Λίγο πριν από την έκθεση, τα ζώα ζυγίζονται και κατόπιν εκτίθενται στην υπό μελέτη συγκέντρωση στην καθορισμένη συσκευή για χρονικό διάστημα τεσσάρων ωρών, μετά από την εξισορρόπηση της συγκεντρώσεως στο θάλαμο. Ο χρόνος εξισορρόπησης θα πρέπει να είναι βραχύς. Η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η δοκιμή θα πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 C. Θεωρητικώς, η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται μεταξύ 30% και 70%, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις (π.χ. δοκιμές ορισμένων αερολυμάτων) αυτό μπορεί να μην είναι πρακτικώς δυνατό. Η διατήρηση ελαφρά αρνητικής πίεσης μέσα στο θάλαμο (≤ 5 mm νερού) εμποδίζει τη διαφυγή της εξεταζόμενης ουσίας στον περιβάλλοντα χώρο. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης δεν θα πρέπει να χορηγείται τροφή και νερό. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα συστήματα για τη δημιουργία και παρακολούθηση της πειραματικής ατμόσφαιρας. Το σύστημα θα πρέπει να εξασφαλίζει την όσο το δυνατόν ταχύτερη αποκατάσταση σταθερών συνθηκών εκθέσεως. Ο σχεδιασμός και λειτουργία του θαλάμου θα πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε μέσα στο θάλαμο να διατηρείται μία ομοιογενής κατανομή της πειραματικής ατμόσφαιρας.

Θα πρέπει να γίνονται μετρήσεις ή παρακολούθηση:

(α) της ταχύτητας ροής του αέρα (συνεχώς),

(β) της πραγματικής συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας στη ζώνη αναπνοής τρεις τουλάχιστον φορές κατά τη διάρκεια της έκθεσης (ορισμένες ατμόσφαιρες, π.χ. αερολύματα σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορεί να χρειάζονται συχνότερη παρακολούθηση). Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η συγκέντρωση δεν θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από το ± 15 % της μέσης τιμής. Εντούτοις, στην περίπτωση ορισμένων αερολυμάτων, ενδέχεται να μη μπορεί να επιτευχθεί το επίπεδο αυτό ελέγχου οπότε είναι αποδεκτό ένα μεγαλύτερο εύρος αποκλίσεων. Στα αερολύματα, θα πρέπει να διενεργείται με την απαιτούμενη συχνότητα, ανάλυση μεγέθους σωματιδίων (τουλάχιστον μία φορά ανά ομάδα πειραματισμού),

(γ) της θερμοκρασίας και υγρασίας, συνεχώς αν είναι δυνατόν.

Κατά τη διάρκεια και μετά την έκθεση, γίνονται τακτικά παρατηρήσεις και καταχωρούνται

συστηματικά G πρέπει να γίνονται ξεχωριστές καταχωρήσεις για κάθε ζώο. Κατά την πρώτη ημέρα οι παρατηρήσεις πρέπει να γίνονται συχνά. Μία φορά την ημέρα πρέπει να γίνεται μια προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις πρέπει να γίνονται καθημερινά και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα για να μειώνεται στο ελάχιστο η απώλεια των ζώων από τη μελέτη G δηλαδή νεκροσίες ή φύξη των ζώων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των ετοιμοθάνατων και αδύνατων ζώων.

Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις του δέρματος και του τριχώματος, των οφθαλμών, των βλεννογόνων, του αναπνευστικού και του κυκλοσοριακού συστήματος, του αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος καθώς και του τρόπου συμπεριφοράς και της σωματοκινητικής δραστηριότητας. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην αναπνευστική συμπεριφορά, στους τρόμους, στους σπασμούς, στη σιελόρροια, στη διάρροια, στο λήθαργο, στον ύπνο και το κώμα. Ο χρόνος θανάτου πρέπει να καταχωρείται όσο το δυνατό ακριβέστερα. Τα ατομικά βάρη των ζώων πρέπει να προσδιορίζονται ανά εβδομάδα μετά την έκθεση και κατά το θάνατο.

Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στο τέλος της, υπόκεινται σε νεκροψία και ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις αλλοιώσεις του αναπνευστικού συστήματος, ανώτερου και κατώτερου. Όλες οι μακροσκοπικά παρατηρούμενες ανωμαλίες πρέπει να καταχωρούνται. Όπου αυτό ενδείκνυται, οι ιστοί πρέπει να λαμβάνονται για ιστοπαθολογική εξέταση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο χρόνος θανάτου χωριστά για κάθε ζώο, ο αριθμός των ζώων που παρουσίασαν άλλα συμπτώματα τοξικότητας και περιγραφή των τοξικών επιδράσεων και των ευρημάτων της νεκροψίας. Αλλαγές στο βάρος πρέπει να υπολογίζονται και να καταχωρούνται όταν τα ζώα επιζούν περισσότερο από μία ημέρα. Τα ζώα που θανατώνονται ανώδυνα λόγω δυσφορίας ή πόνου που έχει σχέση με την ουσία, καταγράφονται ως θάνατοι που σχετίζονται με την ουσία. Η LC50 θα πρέπει να προσδιορίζεται με μια αναγνωρισμένη μέθοδο. Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει τη σχέση, αν υπάρχει, μεταξύ της έκθεσης των ζώων στην ελεγχόμενη ουσία και τη συχνότητα και σοβαρότητα όλων των ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων αυτών της συμπεριφοράς και των κλινικών ανωμαλιών, μακροσκοπικών αλλοιώσεων, αλλαγών του βάρους του σώματος, θνησιμότητας και κάθε άλλης τοξικής επίδρασης.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

- είδος, φυλή, πηγή, περιβαλλοντικές συνθήκες, διατροφή, κλπ. G

- συνθήκες δοκιμής: Περιγραφή της συσκευής έκθεσης συμπεριλαμβανομένου του σχεδίου, του τύπου, των διαστάσεων, της πηγής του αέρα, του συστήματος παραγωγής αερολυμάτων, της μεθόδου κλιματισμού του αέρα και της μεθόδου εγκλωβισμού των ζώων στο θάλαμο δοκιμής, όταν χρησιμοποιείται. Θα πρέπει να περιγράφεται ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, και των συγκεντρώσεων και κατανομής μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων.

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης συμπεριλαμβανομένου του σχεδίου, του τύπου, των διαστάσεων, της πηγής του αέρα, του συστήματος παραγωγής αερολυμάτων, της μεθόδου κλιματισμού του αέρα και της μεθόδου εγκλωβισμού των ζώων στο θάλαμο δοκιμής, όταν χρησιμοποιείται. Θα πρέπει να περιγράφεται ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας, και των συγκεντρώσεων και κατανομής μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων.

Δεδομένα έκθεσης

Τα δεδομένα αυτά θα πρέπει να καταγράφονται σε πίνακα και να παρουσιάζονται με μέσες τιμές και ένα μέτρο μεταβλητότητας (π.χ. μέση τυπική απόκλιση) και, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνουν:

- (α) τις τιμές ροής του αέρα διαμέσου της αναπνευστικής συσκευής,
- (β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα,
- (γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (ολική ποσότητα της εξεταζόμενης ουσίας που προσάγεται στην αναπνευστική συσκευή διηρημένη δια του όγκου του αέρα),
- (δ) φύση του φορέα, αν χρησιμοποιήθηκε,
- (ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στην πειραματική ζώνη αναπνοής,
- (ζ) τη μέση αεροδυναμική διάμετρο μάζας (ΜΑΔΜ) και τη γεωμετρική τυπική απόκλιση (ΓΤΑ),
- (η) το χρονικό διάστημα εξισορρόπησης,
- (θ) το χρονικό διάστημα έκθεσης,

- καταγραφή σε πίνακα των δεδομένων αποκρίσεως κατά φύλο και επίπεδο έκθεσης (δηλ. ο αριθμός ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής G αριθμός ζώων που εμφάνισαν συμπτώματα τοξικότητας G αριθμός εκτεθέντων ζώων) G

- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια ή μετά από την έκθεση, λόγους και κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανώδυνη θανάτωση ζώων G

- όλες τις παρατηρήσεις G

- τιμή LC50 για κάθε φύλο προσδιορισμένη στο τέλος της περιόδου παρατήρησης (με καθορισμένη μέθοδο υπολογισμού) G

- όριο αξιοπιστίας 95% για την LC50 (όπου είναι δυνατόν) G

- καμπύλη δόσης/θνησιμότητας και κλίση (όπου το επιτρέπει η μέθοδος προσδιορισμού) G

- ευρήματα νεκροσίας G

- κάθε ιστοπαθολογικό εύρημα G

- συζήτηση των αποτελεσμάτων (ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στο αποτέλεσμα που μπορεί να έχει στην υπολογιζόμενη τιμή LC50 η ανώδυνη θανάτωση ζώων κατά τη διάρκεια της δοκιμής) G

- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

B.3. ΟΞΕΙΑ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η εξεταζόμενη ουσία επιτίθεται στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις σε διάφορες ομάδες πειραματοζώων, για κάθε δε ομάδα χρησιμοποιείται και μία δόση. Ακολούθως, γίνονται παρατηρήσεις των επιδράσεων και των θανάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής υποβάλλονται σε νεκροψία όπως επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία και τα ζώα που επιζούν μετά το πέρας της δοκιμής.

Τα ζώα που εμφανίζουν έντονα και διαρκή συμπτώματα δυσφορίας και πόνου μπορεί αν χρειασθεί να θανατωθούν ανώδυνα. Δεν χρειάζεται να γίνεται χορήγηση της εξεταζόμενης ουσίας με τρόπο που είναι γνωστό ότι προκαλεί έντονο πόνο και αγωνία λόγω διαβρωτικών ή ερεθιστικών ιδιοτήτων.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. Προετοιμασίες

Τα ζώα κρατούνται μέσα στους πειραματικούς κλωβούς τους, κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής, για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία υγιή, νεαρά, ενήλικα ζώα ξεχωρίζονται τυχαία και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες. Περίπου 24 ώρες πριν από τη δοκιμασία, το τρίχωμα πρέπει να απομακρύνεται με τη βοήθεια ψαλιδιού ή ξυριστικής μηχανής, από την περιοχή της ράχης του κορμού των ζώων. Κατά το κούρεμα ή ξύρισμα του τριχώματος, προσοχή πρέπει να δίνεται ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος, πράγμα το οποίο μπορεί να μεταβάλει τη διαπερατότητά του. Η επιφάνεια της εφαρμογής δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10% της ολικής επιφάνειας του σώματος. Όταν δοκιμάζονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν αν χρειάζεται, η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να υγραίνεται αρκετά με νερό ή, όπου είναι ανάγκη, με έναν κατάλληλο φορέα για να εξασφαλίζεται καλή επαφή με το δέρμα. Όταν χρησιμοποιείται φορέας, η επίδρασή του στη δίοδο της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται γενικά αδιάλυτες.

1.6.2. Συνθήκες δοκιμής

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο ενήλικας επίμυς ή το κουνέλι. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, για τη χρησιμοποίησή τους όμως απαιτείται αιτιολόγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές. Για κάθε φύλο, το εύρος της διαφοράς βαρών των ζώων στην αρχή της δοκιμής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της συνιστάμενης μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Για κάθε επίπεδο δόσεως χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 5 ζώα. Και τα πέντε πρέπει να είναι του ίδιου φύλου. Αν χρησιμοποιούνται θηλυκά, θα πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Όπου υπάρχουν πληροφορίες ότι ένα φύλο είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητο, η χορήγηση της ουσίας θα πρέπει να γίνεται στα ζώα αυτού του φύλου.

Σημείωση: Σε δοκιμές οξείας τοξικότητας με ζώα υψηλότερης τάξης από την τάξη των τρωκτικών, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρησιμοποίησης μικρότερου αριθμού ζώων. Οι δόσεις θα πρέπει να επιλέγονται με προσοχή ενώ θα πρέπει να καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε να μη γίνεται υπέρβαση μετρίως τοξικών δόσεων. Στις δοκιμές αυτές, θα πρέπει να αποφεύγεται να χορηγούνται θανατηφόρες δόσεις της εξεταζόμενης ουσίας.

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να είναι επαρκή ως προς τον αριθμό, τουλάχιστον τρία, και να απέχουν μεταξύ τους αρκετά ώστε να παρέχουν ομάδες πειραματισμού με εύρος τοξικών επιδράσεων και ποσοστών θνησιμότητας. Κατά τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τα επίπεδα δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κάθε ερεθιστική ή διαβρωτική επίδραση. Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι αρκετά για τη χάραξη καμπύλης δόσεως/αποκρίσεως και, όπου είναι δυνατόν, να δίνουν τη δυνατότητα αποδεκτού προσδιορισμού της LD50.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμή

Σε ομάδα 5 αρσενικών και 5 θηλυκών ζώων, μπορεί να πραγματοποιηθεί οριακή δοκιμή σε επίπεδο μιας δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος, χρησιμοποιώντας τις διαδικασίες που περιγράφονται ανωτέρω. Αν παρουσιασθεί θνησιμότητα σχετιζόμενη με την ουσία, μπορεί να χρειασθεί η πραγματοποίηση πλήρους μελέτης.

1.6.2.5. Περίοδος παρατήρησης

Η περίοδος παρατήρησης θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 14 ημέρες. Εντούτοις, η διάρκεια των παρατηρήσεων δεν πρέπει να είναι αυστηρά καθορισμένη. Μπορεί να καθορίζεται από τις τοξικές επιδράσεις, την τάξη εμφανίσεώς τους και τη διάρκεια της περιόδου αναρρώσεως G μπορεί έτσι να επεκτείνεται όταν αυτό θεωρηθεί αναγκαίο. Ο χρόνος εμφάνισης και εξαφανίσεως των τοξικών συμπτωμάτων, η διάρκειά τους και ο χρόνος θανάτου είναι σημαντικά, ιδιαίτερα αν υπάρχει τάση να αργοπορούν οι θάνατοι.

1.6.3. Διαδικασία

Τα ζώα θα πρέπει να εγκλωβίζονται κατ'άτομο. Η εξεταζόμενη ουσία θα πρέπει να επιτίθεται

ομοιόμορφα σε μια περιοχή που να αντιστοιχεί στο 10% περίπου του συνολικού εμβαδού της επιφάνειας του σώματος. Στην περίπτωση λίαν τοξικών ουσιών, το εμβαδόν της καλυπτόμενης επιφάνειας μπορεί να είναι μικρότερο, πάντως όμως θα πρέπει να καλύπτεται η μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια με ένα όσο το δυνατόν λεπτότερο και πιο ομοιόμορφο στρώμα.

Η ελεγχόμενη ουσία πρέπει να κρατείται σ'επαφή με το δέρμα καθ'όλη τη διάρκεια της εκθέσεως των 24 ωρών, με τη βοήθεια ενός επιδέσμου από πορώδη γάζα και μια μη ερεθιστική ταινία. Η ελεγχόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται με τον κατάλληλο τρόπο για να συγκρατείται ο επίδεσμος και η ελεγχόμενη ουσία και να εξασφαλίζεται έτσι η αδυναμία καταπόσεως της ουσίας από τα ζώα. Επιτρέπεται η χρήση συσκευών περιορισμού για να εμποδίζεται η κατάποση, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας.

Στο τέλος της περιόδου εκθέσεως, πρέπει να απομακρύνεται το υπόλειμμα της ελεγχόμενης ουσίας, όταν αυτό είναι δυνατόν, με τη χρήση νερού ή με μια άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταχωρούνται συστηματικά, όπως γίνονται. Πρέπει να διατηρούνται ατομικά αρχεία για κάθε ζώο. Οι παρατηρήσεις, κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας, πρέπει να γίνονται συχνά. Τουλάχιστον μια φορά την ημέρα πρέπει να γίνεται μια προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις θα πρέπει να γίνονται καθημερινά και να λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα ώστε να μειώνεται στο ελάχιστο η απώλεια των ζώων από τη μελέτη. Α.χ. νεκροψία ή ψύξη εκείνων των ζώων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των αδύνατων και ετοιμοθάνατων ζώων.

Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις του τριχώματος, του εξεταζόμενου δέρματος, των οφθαλμών και των βλεννογόνων, όπως επίσης του αναπνευστικού, κυκλοφοριακού, αυτόνομου και κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και αλλοιώσεις στη σωματοκινητική δραστηριότητα και του τρόπου συμπεριφοράς. Με ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να γίνονται οι παρατηρήσεις των τρόμων, σπασμών, σιελόρροιας, διάρροιας, λήθαργου, ύπνου και κόματος. Ο χρόνος θανάτου πρέπει να καταχωρείται όσο το δυνατόν ακριβέστερα. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, υπόκεινται σε νεκροψία. Όλες οι μακροσκοπικά παρατηρούμενες αλλοιώσεις πρέπει να καταχωρούνται. Όπου ενδείκνυται, οι ιστοί πρέπει να λαμβάνονται για ιστοπαθολογική εξέταση.

Εκτίμηση τοξικότητας στο άλλο φύλο

Αφού συμπληρωθεί η μελέτη σε ένα φύλο, η ουσία χορηγείται σε μία τουλάχιστον ομάδα 5 ζώων του άλλου φύλου για να επιβεβαιωθεί ότι τα ζώα αυτού του φύλου δεν είναι σε σημαντικό βαθμό πιο ευαίσθητα στην εξεταζόμενη ουσία. Σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μπορεί να δικαιολογείται η χρήση λιγότερων ζώων. Όπου υπάρχουν σαφείς πληροφορίες ότι τα ζώα του εξεταζόμενου φύλου είναι σε σημαντικό βαθμό πιο ευαίσθητα, μπορεί να μη χρειασθεί η υποβολή σε δοκιμή ζώων του άλλου φύλου.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο χρόνος θανάτου για κάθε ζώο, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν άλλα συμπτώματα τοξικότητας, περιγραφή των τοξικών επιδράσεων και τα αποτελέσματα της νεκροψίας. Τα ατομικά βάρη των ζώων πρέπει να προσδιορίζονται και να καταχωρούνται, λίγο πριν την εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας ανά εβδομάδα μετά, και κατά το θάνατο. Αλλαγές στο βάρος θα πρέπει να υπολογίζονται και να

καταγράφονται, εφόσον τα ζώα επιζούν περισσότερο από μία ημέρα. Τα ζώα που θανατώνονται ανώδυνα λόγω δυσφορίας και πόνου που οφείλεται στην ουσία, καταγράφονται ως θάνατοι που σχετίζονται με την ουσία. Η LD50 θα πρέπει να προσδιορίζεται με μια αναγνωρισμένη μέθοδο.

Η αξιολόγηση των δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει μια αξιολόγηση της σχέσης, αν αυτή υπάρχει, μεταξύ της έκθεσης των ζώων στην ελεγχόμενη ουσία και της συχνότητας και σοβαρότητας όλων των ανωμαλιών, όπου περιλαμβάνονται ανωμαλίες συμπεριφοράς, κλινικές ανωμαλίες, μακροσκοπικές αλλοιώσεις, αλλαγές του βάρους του σώματος, θνησιμότητα, και κάθε άλλη τοξικολογική επίδραση.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

- είδος, φυλή, πηγή, περιβαλλοντικές συνθήκες, διατροφή, κλπ. G
- συνθήκες δοκιμής (συμπεριλαμβανόμενης και της μεθόδου καθαρισμού του δέρματος και του τύπου της επίδεσης: προσροφητικής ή μη προσροφητικής) G
- επίπεδα δόσεων (με φορέα, εφόσον χρησιμοποιήθηκε, και συγκεντρώσεις) G
- φύλο των υποβληθέντων σε δοκιμή ζώων G
- καταγραφή σε πίνακα των δεδομένων απόκρισης κατά φύλο και επίπεδο έκθεσης (δηλ., ο αριθμός ζώων που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής, αριθμός ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, αριθμός εκτεθέντων ζώων) G
- χρόνο θανάτου μετά από τη χορήγηση, λόγους και κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανώδυνη θανάτωση ζώων G
- όλες τις παρατηρήσεις G
- τιμή LD50 για το φύλο που υποβλήθηκε σε πλήρη μελέτη, προσδιορισμένη μετά από 14 ημέρες με την καθορισμένη μέθοδο υπολογισμού G
- όριο αξιοπιστίας 95 % για την LD50 (όπου είναι δυνατόν) G
- καμπύλη δόσης/θνησιμότητας και κλίση (όπου το επιτρέπει η μέθοδος προσδιορισμού) G
- ευρήματα νεκροψίας G
- κάθε ιστοπαθολογικό εύρημα G
- αποτελέσματα οποιασδήποτε δοκιμής στο άλλο φύλο G
- συζήτηση των αποτελεσμάτων (ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην επίδραση που μπορεί να έχει στην υπολογιζόμενη τιμή LD50 η ανώδυνη θανάτωση των ζώων) G

- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

-B. 6
ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**

1.1. **Εισαγωγή**

Παρατηρήσεις

Η ευαισθησία των δοκιμών και η ικανότητά τους να ανιχνεύσουν πιθανούς ευαισθητοποιητές του δέρματος του ανθρώπου θεωρούνται σημαντικά στοιχεία για ένα σύστημα ταξινόμησης της τοξικότητας που αφορά τη δημόσια υγεία.

Δεν υπάρχει μία ενιαία μέθοδος δοκιμής που να προσδιορίζει επαρκώς όλες τις ουσίες οι οποίες δύναται να προκαλέσουν ευαισθητοποίηση του δέρματος του ανθρώπου και που να είναι κατάλληλη για όλες τις ουσίες.

Στην επιλογή μιας δοκιμής, πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως τα φυσικά χαρακτηριστικά μιας ουσίας, συμπεριλαμβανομένης και της ικανότητάς της να διεισδύει στο δέρμα.

Έχουν αναπτυχθεί δύο τύποι δοκιμών που χρησιμοποιούν ινδικά χοιρίδια: οι δοκιμές με βοηθητική ουσία, όπου μια αλλεργική κατάσταση ενεργοποιείται με τη διάλυση ή την παρασκευή εναιωρήματος της εξεταζόμενης ουσίας στο Freund's Complete Adjuvant (FCA) και οι δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία.

Οι δοκιμές με βοηθητική ουσία είναι ενδεχομένως πιο ακριβείς στην πρόβλεψη πιθανής ευαισθητοποιητικής αντίδρασης μιας ουσίας στο δέρμα του ανθρώπου, σε σχέση με τις μεθόδους στις οποίες δεν χρησιμοποιείται FCA και κατά συνέπεια προτιμούνται.

Η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικό χοιρίδιο (DMIX) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη δοκιμή με βοηθητική ουσία. Αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι για την ανίχνευση της δυνατότητας μιας ουσίας να προκαλέσει αντίδραση ευαισθητοποίησης του δέρματος, η DMIX θεωρείται ότι είναι η προτιμότερη τεχνική με βοηθητική ουσία.

Για πολλές τάξεις χημικών ουσιών, οι δοκιμές χωρίς βοηθητική ουσία (από αυτές προτιμάται η δοκιμή Buehler) θεωρούνται λιγότερο ευαίσθητες.

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι σκόπιμο να επιλεγεί η δοκιμή Buehler η οποία περιλαμβάνει τοπική εφαρμογή αντί της ενδοδερμικής έγχυσης που χρησιμοποιείται στη DMIX. Η χρησιμοποίηση της δοκιμής Buehler πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά.

Στη μέθοδο αυτή περιγράφονται η δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικά χοιρίδια (DMIX) και η δοκιμή Buehler. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι με την προϋπόθεση ότι είναι έγκυρες και ότι αιτιολογούνται επιστημονικά.

Εάν προκύψει θετικό αποτέλεσμα από μία αξιόπιστη προκαταρκτική δοκιμή, η ελεγχόμενη ουσία μπορεί να χαρακτηριστεί ως εν δυνάμει ευαισθητοποιός και ενδέχεται να μην είναι αναγκαία η διεξαγωγή DMIX. Ωστόσο, εάν προκύψει αρνητικό αποτέλεσμα σε μία τέτοια δοκιμή, θα πρέπει να γίνει η DMIX σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται κατωτέρω.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος B.

1.2. **Ορισμοί**

Ευαισθητοποίηση δέρματος: (αλλεργική δερματίτις εξ' επαφής) δερματική αντίδραση ανοσολογικής φύσεως σε μια ουσία. Στον άνθρωπο, η αντίδραση αυτή μπορεί να χαρακτηρίζεται από κνησμό, ερύθημα, οίδημα, βλατίδες, φυσαλίδες, πομφόλυγες ή συνδυασμό αυτών. Σε άλλα είδη, οι αντιδράσεις είναι δυνατόν να διαφέρουν και να εμφανίζεται μόνο ερύθημα ή οίδημα.

Έκθεση διέγερσης: πειραματική έκθεση υποκειμένου στην ελεγχόμενη ουσία με σκοπό την πρόκληση κατάστασης υπερευαισθησίας.

Περίοδος διάγερσης: περίοδος μιας τουλάχιστον εβδομάδας μετά την έκθεση διέγερσης, κατά τη διάρκεια της οποίας είναι δυνατόν να εκδηλωθεί υπερευαισθησία.

Έκθεση πρόκλησης: πειραματική έκθεση, μετά την περίοδο διέγερσης, υποκειμένου εκτεθέντος προηγουμένως σε εξεταζόμενη ουσία, προκειμένου να διαπιστωθεί αν το υποκείμενο αυτό αντιδρά με υπερευαισθησία.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Η ευαισθησία και η αξιοπιστία της χρησιμοποιηθείσας πειραματικής τεχνικής πρέπει να αξιολογούνται ανά εξάμηνο με τη χρήση ουσιών οι οποίες είναι γνωστό ότι μπορούν να προκαλέσουν ήπια έως μέτρια ευαισθητοποίηση του δέρματος.

Εφ' όσον η δοκιμή έχει διεξαχθεί ορθά, θα πρέπει να αναμένεται για τους ήπιους έως μέτριους ευαισθητοποιητές ποσοστό απόκρισης τουλάχιστον 30% στις δοκιμές με δομητική ουσία και τουλάχιστον 15% στις δοκιμές χωρίς δομητική ουσία.

Προτιμούνται οι ακόλουθες ουσίες:

Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS	Ονομασία EINECS	Κοινή Ονομασία
101-86-0	202-983-3	α-εξυλοκινναμυλαδεύδη	α-εξυλοκινναμυλαδεύδη
149-30-4	205-736-8	δενζοθειαζολο-2-θειόλη (μερκαπτοδενζοθειαζόλη)	kaptax
94-07-7	202-303-5	δενζοκαΐνη	νορκαΐνη

Σε ορισμένες δεόντως αιτιολογημένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλλες ουσίες που πληρούν τα προαναφερθέντα κριτήρια.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Τα πειραματόζωα εκτίθενται αρχικά στη δοκιμαζόμενη ουσία με ενδοδερμικές ενέσεις και/ή επιδερμική επίθεση (έκθεση διέγερσης). Μετά από μια περίοδο ανάπαυσης 10 έως 14 ημερών (περίοδος διέγερσης), κατά τη διάρκεια της οποίας είναι δυνατόν να εμφανιστεί ανοσολογική αντίδραση, τα ζώα εκτίθενται σε μια δόση πρόκλησης. Η έκταση και ο βαθμός της δερματικής αντίδρασης των πειραματόζωων στην έκθεση πρόκλησης συγκρίνεται με την αντίστοιχη αντίδραση των ζώων μαρτύρων τα οποία αφού εκτεθούν σε σκεύασμα placebo (κατά τη διέγερση) υποβάλλονται σε έκθεση πρόκλησης.

1.5. Περιγραφή των μεθόδων δοκιμής

Σε περίπτωση που απαιτείται απομάκρυνση της ελεγχόμενης ουσίας από το δέρμα, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί νερό ή κατάλληλος διαλύτης ώστε να μην αλλοιωθεί η εμφανισθείσα αντίδραση και να διατηρηθεί η ακεραιότητα της επιδερμίδας.

1.5.1. Δοκιμή μεγιστοποίησης σε ινδικό χοιρίδιο (DMIX)

1.5.1.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ενήλικα ινδικά χοιρίδια (albino) εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Πριν από τη δοκιμή τα ζώα λαμβάνονται τυχαία και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής. Το τρίχωμα αφαιρείται με κούρεμα, ξύρισμα ή, εφ' όσον είναι δυνατόν, με χημική αποτρίχωση, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφευχθεί η λίσση της συνεχείας του δέρματος. Τα ζώα ζυγίζονται πριν από την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της.

1.5.1.2. Συνθήκες δοκιμής

1.5.1.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται συνήθεις φυλές ινδικών χοιριδίων albino εργαστηρίου.

1.5.1.2.2. Αριθμός και φύλο

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά και/ή θηλυκά ζώα. Αν χρησιμοποιηθούν θηλυκά, αυτά θα πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Για την ομάδα αγωγής χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα και για την ομάδα των μαρτύρων τουλάχιστον 5 ζώα. Όταν έχουν χρησιμοποιηθεί λιγότερα από 20 πειραματόζωα και λιγότερα από 10 ζώα-μάρτυρες και δεν είναι δυνατόν να συναχθεί συμπέρασμα για την ευαισθητοποιού δράση της ουσίας, συνιστάται ιδιαίτερος η διεξαγωγή δοκιμής και με άλλα ζώα ώστε να συμπληρωθεί ο αριθμός των 20 πειραματόζωων και 10 μαρτύρων τουλάχιστον.

1.5.1.2.3. Επίπεδα δόσεων

Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας σε κάθε έκθεση διέγερσης πρέπει να είναι καλώς ανεκτή διασυστημικά και να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη συγκέντρωση που προκαλεί ήπιο έως μέτριας εντάσεως ερεθισμό του δέρματος. Η χρησιμοποιούμενη στην έκθεση πρόκλησης συγκέντρωση πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δόση που δεν προκαλεί ερεθισμό. Εφ' όσον απαιτείται, οι κατάλληλες συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από πιλοτική μελέτη με 2 ή 3 πειραματόζωα. Για το σκοπό αυτό, είναι σκόπιμο να χρησιμοποιούνται ζώα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή με FCA.

1.5.1.3. Διαδικασία

1.5.1.3.1. Διέγερση

Ημέρα 0 — ομάδα αγωγής

Στην περιοχή του ώμου από την οποία έχει αφαιρεθεί προηγουμένως το τρίχωμα διενεργούνται τρία ζεύγη ενδοδερμικών ενέσεων των 0,1 ml, το καθένα εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης.

Ένεση 1: μείγμα FCA / νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Ένεση 2: επιλεγμένη συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα.

Ένεση 3: παρασκεύασμα της ελεγχόμενης ουσίας στην επιλεγμένη συγκέντρωση σε μείγμα FCA / νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Στην ένεση 3, οι υδατοδιαλυτές ουσίες διαλύονται στην υδατική φάση προτού αναμιχθούν με το FCA. Για τις λιποδιαλυτές ή αδιάλυτες ουσίες, σχηματίζεται εναιώρημα στο FCA προτού αναμιχθούν με την υδατική φάση. Η τελική συγκέντρωση της ελεγχόμενης ουσίας ισούται με εκείνη της ένεσης 2.

Οι ενέσεις 1 και 2 διενεργούνται σε μικρή απόσταση μεταξύ τους πολύ κοντά στο κεφάλι ενώ η ένεση 3 διενεργείται προς το ουραίο τμήμα της εξεταζόμενης περιοχής.

Ημέρα 0 — ομάδα μάρτυρας

Διενεργούνται τρία ζεύγη ενδοδερμικών ενέσεων των 0,1 ml στις ίδιες θέσεις με την ομάδα αγωγής.

Ένεση 1: μείγμα FCA / νερό ή φυσιολογικό ορό αναλογίας 1:1 (v/v).

Ένεση 2: μη αραιωμένος φορέας

Ένεση 3: παρασκεύασμα του φορέα σε συγκέντρωση 50 % w/v σε μείγμα FCA και νερού ή φυσιολογικού ορού αναλογίας 1:1 (v/v).

5η-7η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Σε περίπτωση που η ουσία δεν είναι ερεθιστική για το δέρμα, είκοσι τέσσερις περίπου ώρες πριν από την τοπική εφαρμογή διέγερσης, και αφού προηγηθεί κούρεμα και/ή ξύρισμα του τριχώματος της εξεταζόμενης περιοχής, αυτή επιχρίεται με 0,5 ml 10 % δωδεκυλοθειικού νατρίου σε βαζελίνη, προκειμένου να προκληθεί τοπικός ερεθισμός.

6η-8η ημέρα — ομάδα αγωγής

Αφαιρείται και πάλι το τρίχωμα από την εξεταζόμενη περιοχή. Διηθητικό χαρτί διαστάσεων 2 cm × 4 cm κορδύνεται με την ελεγχόμενη ουσία σε κατάλληλο φορέα, εφαρμόζεται στην εξεταζόμενη περιοχή και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 48 ώρες με πιεστικό επίδεσμο. Η επιλογή του φορέα πρέπει να αιτιολογείται. Ουσίες σε στερεή μορφή λεπτοκονιοποιούνται και ενσωματώνονται σε κατάλληλο φορέα. Υγρές ουσίες μπορούν να εφαρμόζονται χωρίς προηγούμενη αραιώση, εφ' όσον είναι σκόπιμο.

6η-8η ημέρα — ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται και πάλι το τρίχωμα από την εξεταζόμενη περιοχή στην οποία εφαρμόζεται στη συνέχεια μόνον ο φορέας με τον τρόπο που περιγράφεται ανωτέρω, και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 48 ώρες με αδιαπέραστο επίδεσμο.

1.5.1.3.2. Πρόκληση

20ή-22η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα από τις πλευρές των ζώων της ομάδας αγωγής και της ομάδας μάρτυρων. Στη μία πλευρά των ζώων εφαρμόζεται επίθεμα ή κάψουλα με την ελεγχόμενη ουσία και εφ' όσον είναι σκόπιμο, στην άλλη πλευρά εφαρμόζεται επίθεμα ή κάψουλα που περιέχει μόνο φορέα. Τα επίθεμα διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 24 ώρες με αδιαπέραστο επίδεσμο.

1.5.1.3.3. Παρατήρηση και θαυμολόγηση: ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

- 21 περίπου ώρες μετά την απομάκρυνση του επιθέματος η περιοχή πρόκλησης καθαρίζεται, κουρεύεται και/ή ξυρίζεται και αποτριχώνεται εάν είναι αναγκαία,
- 3 περίπου ώρες αργότερα (περίπου 48 ώρες από την έναρξη της πρόκλησης) παρατηρείται η αντίδραση του δέρματος και καταγράφεται σύμφωνα με τους θαυμούς του προσαρτήματος,
- 24 περίπου ώρες μετά την παρατήρηση αυτή, διενεργείται δεύτερη παρατήρηση (72 ώρες) η οποία και καταγράφεται.

Συνιστάται τυφή ανάγνωση των αποτελεσμάτων από τα ζώα δοκιμής και τους μάρτυρες.

Εάν απαιτείται αποσαφήνιση των ληφθέντων αποτελεσμάτων από την πρώτη πρόκληση, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δεύτερης πρόκλησης (επαναπρόκληση), μια εβδομάδα περίπου μετά την πρώτη, με νέα ομάδα μάρτυρα, εφ' εφόσον είναι αναγκαίο. Επαναπρόκληση μπορεί να διεξαχθεί και με την αρχική ομάδα μάρτυρα.

Όλες οι δερματικές αντιδράσεις και τα ασυνήθη ειρήματα, συμπεριλαμβανομένων των διασυστημικών αντιδράσεων, που προκύπτουν από τις διαδικασίες διέγερσης και πρόκλησης πρέπει να παρατηρούνται και να καταγράφονται σύμφωνα με την κλίμακα Magnusson/Kligman (βλ. προσάρτημα). Για την αποσαφήνιση αμφισβητούμενων αντιδράσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες διαδικασίες όπως η ιστοπαθολογική εξέταση ή η μέτρηση του πάχους των πτυχώσεων του δέρματος.

1.5.2. Δοκιμή Buehler

1.5.2.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ενήλικα ινδικά χοιρίδια albino εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής. Πριν από τη δοκιμή, τα ζώα λαμβάνονται τυχαία και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής. Το τρίχωμα αφαιρείται με κούρεμα, ξύρισμα ή, εφ' όσον είναι δυνατόν με χημική αποτριχώση, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο δοκιμής. Λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η λύση της συνεχείας του δέρματος. Τα ζώα ζυγίζονται πριν από την έναρξη της δοκιμής και στο τέλος της.

1.5.2.2. Συνθήκες δοκιμής

1.5.2.2.1. Πειραματόζωα

Χρησιμοποιούνται συνήθεις φυλές ινδικών χοιριδίων albino εργαστηρίου.

1.5.2.2.2. Αριθμός και φύλο

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρσενικά και/ή θηλυκά ζώα. Αν χρησιμοποιηθούν θηλυκά, αυτά πρέπει να είναι άτοκα και να μην ευρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης.

Για την ομάδα αγωγής χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα και για την ομάδα των μαρτύρων τουλάχιστον 10 ζώα.

1.5.2.2.3. Επίπεδα δόσεων

Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας σε κάθε έκθεση διέγερσης πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δυνατή συγκέντρωση που προκαλεί ήπιο αλλά όχι υπέρμετρο ερεθισμό. Η χρησιμοποιούμενη στην έκθεση πρόκλησης συγκέντρωση πρέπει να αντιπροσωπεύει την υψηλότερη δόση που δεν προκαλεί ερεθισμό. Εφ' όσον απαιτείται, οι κατάλληλες συγκεντρώσεις προσδιορίζονται από πιλοτική μελέτη με 2 ή 3 πειραματόζωα.

Για τις υδατοδιαλυτές ουσίες, ως φορέας συνιστάται το νερό ή αραιό διάλυμα μη ερεθιστικής ταξενεργού ουσίας. Για τις άλλες ελεγχόμενες ουσίες προτιμάται η χρήση μείγματος 80% αιθανόλης/νερού στην έκθεση διέγερσης και ακετόνης στην έκθεση πρόκλησης.

1.5.2.3. Διαδικασία

1.5.2.3.1. Διέγερση

Ημέρα 0 — ομάδα αγωγής

Αφαιρείται το τρίχωμα από τη μια πλευρά του ζώου (με κούρεμα). Το επίθεμα δοκιμής κορέννεται με ελεγχόμενη ουσία, σε κατάλληλο φορέα (η επιλογή του φορέα πρέπει να αιτιολογείται: υγρές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιούνται, αν είναι σκόπιο, χωρίς προηγούμενη αραίωση). Το επίθεμα δοκιμής εφαρμόζεται επί της εξεταζόμενης περιοχής και διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια αδιαπέραστου επίδεσμου ή κάψουλας και καταλλήλου επίδεσμου.

Το επίθεμα δοκιμής πρέπει να είναι αδιαπέραστο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί στρογγυλό ή τετράγωνο επικάλυμμα από βαμβάκι διαστάσεων 4-6 cm² περίπου. Θεωρείται σκόπιμη η χρησιμοποίηση διάταξης συγκράτησης για την εξασφάλιση της αδιαπερατότητας. Σε περίπτωση περιτύλιξης της υπό αγωγή περιοχής ενδέχεται να απαιτηθούν επιπλέον εκθέσεις στην ουσία.

Ημέρα 0 — ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα από τη μια πλευρά του ζώου (με κούρεμα). Εφαρμόζεται μόνον ο φορέας με τον τρόπο που περιγράφεται για την ομάδα αγωγής. Το επίθεμα δοκιμής διατηρείται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια αδιαπέραστου επίδεσμου ή κάψουλας και κατάλληλου επίδεσμου. Εάν είναι δυνατόν να αποδειχθεί ότι η δοκιμή με σκεύασμα placebo σε ομάδα μάρτυρα δεν είναι αναγκαία, επιτρέπεται να χρησιμοποιηθεί ομάδα μάρτυρας στην οποία δεν χορηγείται καμία ουσία.

6η-8η και 13η-15η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

την 6η-8η ημέρα και επίσης την 13η-15η ημέρα, πραγματοποιείται η ίδια εργασία όπως και την ημέρα 0 στην ίδια εξεταζόμενη περιοχή (μετά από αφαίρεση του τριχώματος, αν είναι αναγκαίο) της ίδιας πλευράς.

1.5.2.3.2. Πρόκληση

27η-29η ημέρα — ομάδα αγωγής και ομάδα μάρτυρας

Αφαιρείται το τρίχωμα (με κούρεμα) από την άλλη πλευρά των ζώων αγωγής και ζώων μαρτύρων η οποία δεν έχει εκτεθεί στην ελεγχόμενη ουσία. Στο οπίσθιο τμήμα της πλευράς αυτής εφαρμόζεται αδιαπέραστος επίδεσμος ή κάψουλα που περιέχει κατάλληλη ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας στη μέγιστη συγκέντρωση που δεν προκαλεί ερεθισμό.

Όταν είναι σκόπιμο, εφαρμόζεται στο εμπρόσθιο μέρος της ίδιας πλευράς των ζώων αγωγής και των ζώων μαρτύρων αδιαπέραστος επίδεσμος ή κάψουλα που περιέχει μόνο φορέα. Τα επίθεμα ή οι κάψουλες διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 6 ώρες με τη βοήθεια κατάλληλου επίδεσμου.

1.5.2.3.3. Παρατήρηση και βαθμολόγηση

— περίπου 21 ώρες μετά την απομάκρυνση του επιθέματος αφαιρείται το τρίχωμα από την περιοχή πρόκλησης.

— περίπου τρεις ώρες αργότερα (δηλ. 30 περίπου ώρες μετά την εφαρμογή του επιθέματος πρόκλησης) παρατηρούνται οι αντιδράσεις του δέρματος και καταγράφονται σύμφωνα με τους βαθμούς του προσαρτήματος.

— περίπου 24 ώρες μετά την τριαντακοντάωρη παρατήρηση (δηλ. 54 περίπου ώρες μετά την εφαρμογή του επιθέματος πρόκλησης) παρατηρούνται εκ νέου και καταγράφονται οι αντιδράσεις του δέρματος.

Συνίσταται τυφλή ανάγνωση των αποτελεσμάτων από τα ζώα δοκιμής και τους μάρτυρες.

Εάν απαιτείται αποσαφήνιση των ληφθέντων αποτελεσμάτων από την πρώτη πρόκληση, θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής δεύτερης πρόκλησης (επαναπρόκληση), μια εβδομάδα περίπου μετά την πρώτη, με νέα ομάδα μάρτυρα, εφ' όσον είναι αναγκαίο. Επαναπρόκληση μπορεί να διεξαχθεί και με την αρχική ομάδα μάρτυρα.

Όλες οι δερματικές αντιδράσεις και τα ασυνήθη ευρήματα, συμπεριλαμβανομένων των διασυστημικών αντιδράσεων, που προκύπτουν από τις διαδικασίες διεγερσης και πρόκλησης πρέπει να παρατηρούνται και να καταγράφονται σύμφωνα με την κλίμακα Magnusson/Kligman (βλ. προσάρτημα). Για την αποσαφήνιση αμφισβητήσιμων αντιδράσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες διαδικασίες όπως η ιστοπαθολογική εξέταση ή η μέτρηση του πάχους των πτυχώσεων του δέρματος.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ (ΔΜΙΧ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΗ BUEHLER)

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα στον οποίο παρουσιάζονται για κάθε ζώο οι δερματικές αντιδράσεις που αντιστοιχούν σε κάθε παρατήρηση.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ (AMIX ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΗ BUEHLER)**

Σε περίπτωση που πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική δοκιμή πριν από τη δοκιμή με ινδικά χοιρίδια παρέχονται περιγραφή ή τα στοιχεία αναφοράς της δοκιμής (επί παραδείγματι, δοκιμή τοπικού λεμφαδένου — LLNA, δοκιμή οιδήματος αντιού ποντικού — MEST) συμπεριλαμβανομένων των λεπτομερειών της διαδικασίας καθώς και τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο με την ελεγχόμενη ουσία όσο και με τις ουσίες αναφοράς.

Εκθεση δοκιμής (AMIX και δοκιμή Buehler)

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει, εφ' όσον είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

Για τα πειραματόζωα:

- φυλή των χρησιμοποιηθέντων ινδικών χοιριδίων,
- αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων,
- πρόελευση, συνθήκες στέγασης, διατροφής, κ.λπ.,
- βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

- τεχνική προετοιμασίας της περιοχής εφαρμογής της ουσίας,
- λεπτομέρειες σχετικά με το επιδερμικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε και την τεχνική της εφαρμογής του,
- αποτέλεσμα της πιλοτικής μελέτης και πόρισμα σχετικά με τις συγκεντρώσεις διέγερσης και πρόκλησης που πρέπει να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία, εφαρμογή και απομάκρυνση της ουσίας,
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- συγκεντρώσεις φορέα και δοκιμαζόμενης ουσίας που χρησιμοποιήθηκαν για τις εκθέσεις διέγερσης και πρόκλησης και συνολική ποσότητα ουσίας που εφαρμόστηκε για διέγερση και πρόκληση.

Για τα αποτελέσματα:

- περίληψη των αποτελεσμάτων του τελευταίου ελέγχου ευαισθησίας και αξιοπιστίας (βλ. 1.3) συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών για την ουσία, τη συγκέντρωση και το φορέα που χρησιμοποιήθηκαν,
- πληροφορίες για κάθε ζώο συμπεριλαμβανομένου του συστήματος βαθμολόγησης,
- αναλυτική περιγραφή της φύσης και του βαθμού των εκδηλώσεων που παρατηρήθηκαν,
- τυχόν ιστοπαθολογικά ευρήματα.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της TG 406 του ΟΟΣΑ.

Προσάρτημα

ΠΙΝΑΚΑΣ:

Κλίμακα Magnusson/Kligman για την αξιολόγηση των αντιδράσεων στη δοκιμή πρόκλησης με επίθεμα

- 0 = καμία ορατή μεταβολή
 - 1 = διακριτικό ή πλακώδες ερύθημα
 - 2 = μέτριας έντασης και συρρέον ερύθημα
 - 3 = έντονο ερύθημα και οίδημα.»
-

B.7 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ (28 ΗΜΕΡΕΣ) ΔΟΣΗΣ (ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.3. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Η δοκιμασμένη ουσία χορηγείται από το στόμα σε ημερήσιες διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματοζώων, μια δόση ανά ομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα εξετάζονται με προσοχή καθημερινά κατά τη διάρκεια της περιόδου χορήγησης για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμής νεκροτομούνται, και στο τέλος της δοκιμής, αυτά που έχουν επιζήσει θανατώνονται και νεκροτομούνται επίσης.

Η παρούσα μέθοδος δίδει μεγαλύτερη έμφαση στις νευρολογικές επιδράσεις ως ειδικό τελικό σημείο καθώς και στην ανάγκη προσεκτικής κλινικής παρατήρησης των ζώων με σκοπό τη συγκέντρωση των περισσότερων δυνατών πληροφοριών. Επιδιώκεται η ταυτοποίηση χημικών ουσιών με νευροτοξικό δυναμικό, πράγμα το οποίο ενδέχεται να απαιτήσει περαιτέρω εις βάθος διερεύνηση του θέματος. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή είναι δυνατόν να παρέχει ενδείξεις για ανοσολογικές επιδράσεις και τοξικότητα στα όργανα αναπαραγωγής.

1.4. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.4.1. Προετοιμασία

Υγιή νεαρά ζώα κατανέμονται τυχαία σε ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Τα κλουβιά διευθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται οι οφειλόμενες στη θέση των κλουβιών επιπτώσεις. Τα ζώα σημαδεύονται και διατηρούνται στα κλουβιά τους επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης προκειμένου να εγκλιματιστούν στις συνθήκες του εργαστηρίου.

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται με αναγκαστική θρέψη ή μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού. Ο τρόπος χορήγησης της ουσίας διά του στόματος εξαρτάται από το σκοπό της μελέτης και από τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της ουσίας.

Εφ' όσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της δοκιμαζόμενης ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνίσταται, εφ' όσον είναι δυνατόν, η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος, ως πρώτη επιλογή, διαλύματος/γαλακτώματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) κατόπιν, και, ως τελευταία επιλογή, η χρήση διαλύματος σε άλλο φορέα. Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, τα τοξικά χαρακτηριστικά του πρέπει να είναι γνωστά. Επίσης πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης ουσίας στον φορέα.

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Πειραματόζωα

Το προτιμότερο είδος είναι ο επίμυς αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλα είδη τρωκτικών. Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνήθεις εργαστηριακές φυλές νεαρών, υγιών ενήλικων ζώων. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Η χορήγηση της ουσίας πρέπει να αρχίσει το ταχύτερο δυνατόν μετά τον απογαλακτισμό και, οπωσδήποτε σε ηλικία μικρότερη των εννέα εβδομάδων.

Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της μέσης τιμής, για κάθε φύλο.

Σε περίπτωση που διεξάγεται προκαταρκτική μελέτη με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα πριν από μία μακροπρόθεσμη μελέτη, είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθούν ζώα της ίδιας φυλής και προέλευσης και για τις δύο μελέτες.

1.4.2.2. Αριθμός και φύλο

Για κάθε επίπεδο δόσεων, πρέπει να χρησιμοποιούνται 10, τουλάχιστον, ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά). Εάν έχουν σχεδιαστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα

πρέπει να αυξηθεί κατά τον αριθμό των ζώων που προγραμματίστηκε να θανατωθούν πριν από τη συμπλήρωση της μελέτης.

Επιπλέον, μια δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (5 ζώα ανά φύλο) πρέπει να υποβληθεί σε αγωγή με την υψηλότερη δόση για 28 ημέρες, ώστε να επιτρέψει παρατηρήσεις για την αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών συμπτωμάτων επί 14 ημέρες μετά το τέλος των χορηγήσεων. Χρησιμοποιείται επίσης και μία δορυφορική ομάδα από 10 ζώα μάρτυρες (πέντε ζώα ανά φύλο).

1.4.2.3. Επίπεδα δόσεων

Γενικά, πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εκτός από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση με τα ζώα της ομάδας αγωγής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας, τα ζώα της ομάδας μάρτυρα πρέπει να λάβουν το φορέα στο μεγαλύτερο όγκο που χρησιμοποιήθηκε.

Αν από την εκτίμηση άλλων δεδομένων προκύπτει ότι η χορήγηση ημερήσιας δόσης 1 000 mg/kg βάρους σώματος δεν αναμένεται να έχει επίδραση, μπορεί να διενεργηθεί οριακή δοκιμή. Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα είναι δυνατόν να διενεργηθεί διερευνητική μελέτη που θα βοηθήσει στον προσδιορισμό των απαιτούμενων δόσεων.

Για την επιλογή των επιπέδων δόσεων πρέπει να ληφθούν υπόψη τυχόν διαθέσιμα δεδομένα για την τοξικότητα και την (τοξικο)κινητική της ελεγχόμενης ουσίας ή σχετικών με αυτή προϊόντων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλέσει τοξικές εκδηλώσεις όχι όμως το θάνατο ή έντονους πόνους. Στη συνέχεια επιλέγεται φθίνουσα σειρά δοσολογικών επιπέδων με σκοπό τον εντοπισμό απόκρισης συνδεδεμένης με τη δόση και του χαμηλοτέρου επιπέδου δόσης στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL). Για τον καθορισμό της φθίνουσας σειράς δοσολογικών επιπέδων τα διπλάσια έως τετραπλάσια μεσοδιαστήματα αποτελούν συνήθως τη βέλτιστη επιλογή. Συχνά προτιμάται η προσθήκη τέταρτης ομάδας αγωγής αντί της χρησιμοποίησης πολύ μεγάλων διαστημάτων (πολλαπλάσια του 10 και άνω) μεταξύ των διαδοχικών δόσεων.

Για τις ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού πρέπει να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες ελεγχόμενης ουσίας δεν επηρεάζουν τη συνήθη ισορροπία του διαιτολογίου ή το ισοζύγιο νερού. Όταν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται με την τροφή, πρέπει να χρησιμοποιείται είτε σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (ppm) είτε σταθερό επίπεδο δόσεων εκφρασμένο επί του βάρους του σώματος του ζώου και να διευκρινίζεται ποιά από τις δύο δυνατότητες έχει επιλεγεί. Για ουσίες που χορηγούνται με αναγκαστική θρέψη η χορήγηση πρέπει να γίνεται ακριβώς την ίδια ώρα κάθε ημέρα. Οι δόσεις πρέπει να προσαρμόζονται ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσεων ως προς το βάρος του σώματος.

Σε περίπτωση που διενεργείται προκαταρκτική μελέτη με επαναλαμβανόμενη δόση από μία μακροπρόθεσμη μελέτη, η χορηγούμενη τροφή πρέπει να είναι η ίδια και στις δύο μελέτες.

1.4.2.4. Οριακή δοκιμή

Εάν μια δοκιμή που έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα ή, εφ' όσον πρόκειται για χορήγηση με την τροφή ή το πόσιμο νερό, με αντίστοιχη αναλογία στην τροφή ή στο πόσιμο νερό (σε σχέση με το βάρος του σώματος), δεν οδηγήσει στην παρατήρηση τοξικών εκδηλώσεων και εάν, βάσει των στοιχείων που διατίθενται για ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται εμφάνιση τοξικότητας, είναι δυνατόν να μην απαιτείται διεξαγωγή πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσεων. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφόσον από την έκθεση του ανθρώπου δεν προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλοτέρου επιπέδου δόσης.

1.4.2.5. Περίοδος παρατήρησης

Η περίοδος παρατήρησης διαρκεί 28 ημέρες. Τα ζώα μίας δορυφορικής ομάδας που θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω παρατηρήσεις πρέπει να αναμείνουν 14 ακόμη ημέρες χωρίς να υποβληθούν σε οιαδήποτε αγωγή, προκειμένου να παρατηρηθεί τυχόν καθυστερημένη εμφάνιση, εμμονή, ή ανάνηψη από τοξικά συμπτώματα.

1.4.3. Διαδικασία

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται στα ζώα καθημερινά επί επτά ημέρες την εβδομάδα για περίοδο 28 ημερών. Εάν η ουσία χορηγείται επί πέντε μόνο ημέρες την εβδομάδα, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Όταν η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται με αναγκαστική θρέψη, η χορήγηση πρέπει να γίνεται εφάπαξ με τη βοήθεια καθετήρα στομάχου ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματοζώου. Ο όγκος αυτός δεν πρέπει να υπερβαίνει το 1 ml/100 g βάρους σώματος, ή τα 2 ml/100 g βάρους σώματος εάν πρόκειται για υδατικά διαλύματα. Εκτός από την περίπτωση των ερεθιστικών ή διαβρωτικών ουσιών οι οποίες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις θα προκαλούσαν έξαρση των συμπτωμάτων, οι διαφορές των χορηγουμένων όγκων ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να ελαχιστοποιούνται ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση, ώστε να εξασφαλιστεί σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

1.4.3.1. Γενικές παρατηρήσεις

Γενικές κλινικές παρατηρήσεις πρέπει να διεξάγονται τουλάχιστον μια φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την(τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο κορυφώσεως των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η κατάσταση της υγείας των ζώων πρέπει να καταγράφεται. Όλα τα ζώα εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα για τη διαπίστωση νοσηρότητας και θνησιμότητας. Τα ετοιμοθάνατα ζώα και τα ζώα που παρουσιάζουν έντονη δυσφορία ή πόνο πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνει αντιληπτό, να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο και να νεκροτομούνται.

Όλα τα ζώα πρέπει να υποβληθούν σε λεπτομερή κλινική παρατήρηση μία φορά πριν από την πρώτη έκθεση (προκειμένου να γίνουν συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων ζώων) και στη συνέχεια τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις αυτές πρέπει να διενεργούνται κατά προτίμηση την ίδια ώρα κάθε φορά, έξω από τα κλουβιά σ' έναν τυποποιημένο χώρο.

Καταγράφονται προσεκτικά, χρησιμοποιώντας κατά προτίμηση συστήματα βαθμολόγησης καθορισμένα σαφώς από το εργαστήριο. Καταβάλλεται κάθε προσπάθεια ώστε οι συνθήκες της δοκιμής να παρουσιάζουν τις ελάχιστες δυνατές διακυμάνσεις και οι παρατηρήσεις να διεξάγονται κατά προτίμηση από άτομα που δεν έχουν ενημερωθεί για την αγωγή.

Καταγράφονται, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στα μάτια, στους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις καθώς και αυτόνομες ενέργειες (όπως δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή της διαμέτρου της κόρης του οφθαλμού, του ρυθμού της αναπνοής). Καταγράφονται επίσης μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση και στην αντίδραση κατά τη μεταχείριση καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του εαυτού τους, συνεχείς περιστροφές) ή περίεργη συμπεριφορά (όπως αυτοακρωτηριασμός, βάδισμα προς τα πίσω),

Την τέταρτη εβδομάδα έκθεσης αξιολογούνται οι αντιδράσεις των αισθητηρίων οργάνων σε διαφόρων ειδών ερεθίσματα (όπως σε ακουστικά, οπτικά και ιδιοδόχα ερεθίσματα) η δύναμη της λαβής και η κινητικότητα. Λεπτομέρειες σχετικά με τις διαδικασίες που μπορούν να ακολουθηθούν παρέχονται στις σχετικές δημοσιεύσεις (βλ. γενική εισαγωγή μέρος Β).

Οι παρατηρήσεις των λειτουργιών που διεξάγονται κατά την τέταρτη εβδομάδα έκθεσης μπορούν να παραλειφθούν εάν η μελέτη προηγείται μελέτης υποχρόνιας τοξικότητας (90 ημερών). Στην περίπτωση αυτή, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών θα πρέπει να περιληφθούν στην επόμενη αυτή μελέτη. Από την άλλη πλευρά όμως, η ύπαρξη δεδομένων για τις λειτουργίες από μια μελέτη με επαναλαμβανόμενη δόση είναι δυνατόν να διευκολύνει την επιλογή επίπεδων δόσεων για μια επακόλουθη υποχρόνια μελέτη.

Κατ' εξαίρεση, οι παρατηρήσεις των λειτουργιών μπορούν επίσης να παραλειφθούν όταν οι ομάδες εμφανίζουν εκδηλώσεις τοξικότητας σε σημείο που να επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα της σχετικής με την εξέταση των λειτουργιών δοκιμής.

1.4.3.2. Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής και νερού

Όλα τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον μια φορά την εβδομάδα. Επίσης μια φορά τουλάχιστον την εβδομάδα μετράται η κατανάλωση τροφής και νερού. Εάν η ελεγχόμενη ουσία

χορηγείται με το πόσιμο νερό, η κατανάλωσή του πρέπει επίσης να υπολογίζεται μια φορά την εβδομάδα τουλάχιστον.

1.4.3.3. Αιματολογικές εξετάσεις

Στο τέλος της περιόδου δοκιμής πρέπει να διεξαχθούν οι ακόλουθες αιματολογικές εξετάσεις: προσδιορισμός αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, αριθμού λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων, χρόνου πήξεως και πηκτικότητας του αίματος.

Το αίμα πρέπει να λαμβάνεται από καθορισμένο σημείο αμέσως πριν από τη θανάτωση των ζώων ή κατά τη διάρκειά της, και να διατηρείται υπό κατάλληλες συνθήκες.

1.4.3.4. Κλινικές βιοχημικές εξετάσεις

Κλινικές βιοχημικές εξετάσεις για τη διερεύνηση σοβαρών τοξικών επιδράσεων στους ιστούς και ειδικότερα στα νεφρά και στο ήπαρ, διεξάγονται με αίμα που έχει ληφθεί από όλα τα ζώα αμέσως πριν από τη θανάτωση των ζώων ή κατά τη διάρκειά της (δεν λαμβάνεται αίμα από ετοιμοθάνατα ζώα και/ή από ζώα που θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμής). Συνιστάται τα ζώα να έχουν υποβληθεί σε ολονύκτια νηστεία πριν από την αιμοληψία (1). Οι εξετάσεις στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος περιλαμβάνουν προσδιορισμό νατρίου, καλίου, γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, ουρίας, κρεατινίνης, ολικής πρωτεΐνης και αλβουμίνης, δύο τουλάχιστον ενζύμων ενδεικτικών ηπατοκυτταρικής επίδρασης (όπως της αλανινο-αμινοτρανσφεράσης, της ασπαραγινικής αμινοτρασφεράσης και της δεϋδρογονάσης της σορβιτόλης). Η μέτρηση και άλλων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) καθώς και χολικών οξέων είναι δυνατόν να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες σε ορισμένες περιπτώσεις.

(1) Για ορισμένες μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα του αίματος και ιδίως της γλυκόζης, προτιμάται τα ζώα να έχουν υποβληθεί σε ολονύκτια νηστεία. Ο κυριότερος λόγος για την προτίμηση αυτή είναι ότι οι διακυμάνσεις που είναι αναπόφευκτες σε περίπτωση μη υποβολής τους σε νηστεία, τείνουν να συγκαλύψουν ορισμένες ανεπαίσθητες επιδράσεις δυσκολεύοντας την ερμηνεία. Από την άλλη πλευρά όμως, η νηστεία αυτή μπορεί να επηρεάσει το γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες διατροφής, να διαταράξει την καθημερινή έκθεση στην ελεγχόμενη ουσία. Σε περίπτωση που επιλέγεται η λύση της ολονύκτιας νηστείας, οι κλινικές βιοχημικές εξετάσεις πρέπει να διεξάγονται μετά τις παρατηρήσεις των λειτουργιών της 4ης εβδομάδας της μελέτης.

Κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης μπορούν να διεξαχθούν, προαιρετικά, οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων χρησιμοποιώντας ούρα συλλεχθέντα σε καθορισμένο χρόνο: προσδιορισμός όψης, όγκου, ωσμωτικής πίεσης ή ειδικού βάρους, pH, πρωτεϊνών, γλυκόζης αίματος και αιμοσφαιρίων.

Επιπλέον, πρέπει να διεξάγονται μελέτες για την αναζήτηση στον ορό δεικτών γενικής αλλοίωσης των ιστών. Άλλοι προσδιορισμοί που απαιτούνται όταν οι ιδιότητες της ελεγχόμενης ουσίας ενδέχεται ή αναμένεται να επηρεάσουν τα μεταβολικά χαρακτηριστικά, αφορούν το ασβέστιο, τα φωσφορικά, τα τριγλυκερίδια μετά από νηστεία, ειδικές ορμόνες, τη μεθαιμοσφαιρίνη και τη χοκινεστεράση. Οι προσδιορισμοί αυτοί πρέπει να διεξάγονται για ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή σε συγκεκριμένες περιπτώσεις.

Γενικά πρέπει να ακολουθείται ευέλικτη προσέγγιση, ανάλογα με το είδος και τις παρατηρούμενες και/ή αναμενόμενες επιδράσεις από μια συγκεκριμένη ουσία.

Εάν τα διατιθέμενα βασικά δεδομένα του ιστορικού δεν επαρκούν θα πρέπει να προσδιοριστούν μεταβλητές για τις αιματολογικές και κλινικές βιοχημικές εξετάσεις πριν από την έναρξη της δοκιμής.

1.4.3.5. Νεκροψία

Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη, λεπτομερή νεκροψία η οποία περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομίων, της κρανιακής, θωρακικής και περιτοναϊκής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Συκώτι, νεφρά, επινεφρίδια, όρχεις, επιδιδυμίδες, θύμος αδένας, σπλήνα, εγκέφαλος και καρδιά όλων των ζώων απαλλάσσονται από τους προσφυόμενους ιστούς και ζυγίζονται νωπά όσο το δυνατόν

γρηγορότερα μετά την ανατομή για να αποφευχθεί η ξήρανσή τους.

Οι ιστοί που ακολουθούν πρέπει να διατηρούνται στο μέσο συντήρησης που θεωρείται καταλληλότερο τόσο για το είδος του ιστού όσο και για την ιστοπαθολογική εξέταση για την οποία προορίζεται: κάθε ιστός που εμφανίζει μακροσκοπικές αλλοιώσεις, εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές του κυρίου τμήματος, της παρεγκεφαλίδος και της γέφυρας), νωτιαίος μυελός, στομάχι, λεπτό και παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των Παυέριων πλακών), συκώτι, νεφρά, επινεφρίδια, σπλήνα, καρδιά, θύμος αδένας, θυροειδής αδένας, τραχεία και πνεύμονες (διατηρημένοι με εμφύσηση συντηρητικού ακολουθούμενη από εμβάπτιση), γεννητικοί αδένες, άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος (όπως η μήτρα, ο προστάτης), ουροδόχος κύστις, λεμφαδένες (κατά προτίμηση ένας λεμφαδένας που να καλύπτει την οδό χορήγησης και ένας άλλος, σε αρκετή απόσταση από αυτή, που να καλύπτει τις διασυστημικές επιδράσεις), περιφερειακό νεύρο (ισχυακό ή κνημιαίο) ευρισκόμενο κατά προτίμηση πολύ κοντά στον μυν, και τμήμα του μυελού των οστών ή, ενδεχομένως, νωπό παρασκεύασμα αναρροφηθέντος μυελού). Τα κλινικά και άλλα ευρήματα είναι δυνατόν να καταδείξουν την ανάγκη εξέτασης και άλλων ιστών. Κάθε όργανο που, λόγω των γνωστών ιδιοτήτων της ελεγχόμενης ουσίας, θεωρείται πιθανό να αποτελεί όργανο-στόχο, πρέπει επίσης να διατηρείται.

1.4.3.6. Ιστοπαθολογική εξέταση

Τα διατηρημένα όργανα και οι ιστοί όλων των ζώων των ομάδων υψηλών δόσεων και μάρτυρα πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε περίπτωση που παρατηρούνται αλλοιώσεις συνδεδεμένες με την αγωγή στην ομάδα υψηλής δόσης, η εξέταση επεκτείνεται και στα ζώα των ομάδων που έλαβαν χαμηλότερες δόσεις.

Εξετάζονται όλα τα μακροσκοπικά ευρήματα.

Σε περίπτωση που έχει χρησιμοποιηθεί δορυφορική ομάδα, υποβάλλονται σε ιστοπαθολογική εξέταση οι ιστοί και τα όργανα που έχουν παρουσιάσει αλλοιώσεις στα ζώα των ομάδων αγωγής.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα αγωγής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της αγωγής, τον αριθμό των ζώων που ευρέθησαν νεκρά κατά τη διάρκεια της αγωγής ή θανατώθηκαν για να μην ταλαιπωρηθούν, το χρόνο θανάτου ή θανάτωσης, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν εκδηλώσεις τοξικότητας, περιγραφή των παρατηρηθέντων τοξικών συμπτωμάτων, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισής τους, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν αλλοιώσεις, το είδος των αλλοιώσεων και το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν καθέναν από τους τύπους αλλοιώσεων. Όταν είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με τη βοήθεια στατιστικής μεθόδου γενικής αποδοχής. Οι στατιστικές μέθοδοι πρέπει να επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει, εάν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

Για τα πειραματόζωα:

- είδος/φυλή χρησιμοποιηθέντων ζώων,
- αριθμός ηλικία και φύλο των ζώων,
- προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή, κ.λπ.,
- βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής, στη συνέχεια κατά εβδομαδιαία διαστήματα και στο τέλος της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό,
- αιτιολόγηση της επιλογής του επιπέδου δόσεων,
- λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της δοκιμαζόμενης ουσίας/τροφής, την επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος,

- λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας,
- εφ' όσον είναι σκόπιμο, μετατροπή της συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στην τροφή ή το πόσιμο νερό (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα),
- λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού.

Για τα αποτελέσματα:

- βάρος του σώματος/μεταβολές βάρους σώματος,
- εφόσον είναι σκόπιμο, κατανάλωσης τροφής και νερού,
- δεδομένα τοξικής απόκρισης κατά φύλο και επίπεδο δόσης, συμπεριλαμβανομένων των τοξικών εκδηλώσεων,
- φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη),
- αξιολόγηση των αισθητηρίων λειτουργιών, της δύναμης της λαβής και της κινητικότητας,
- αιματολογικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις με τις αντίστοιχες τιμές αναφοράς,
- βάρος σώματος κατά τη θανάτωση και βάρος των οργάνων,
- ευρήματα νεκροψίας,
- αναλυτική περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
- δεδομένα για την απορρόφηση, εφόσον διατίθενται,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εάν είναι σκόπιμη.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της TG 407 του ΟΟΣΑ

B.8. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ (28 ΗΜΕΡΕΣ) ΔΟΣΗΣ (ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Χρήσιμο είναι να υπάρχουν προκαταρκτικές πληροφορίες για την κατανομή μεγέθους σωματιδίων, την τάση ατμών, το σημείο τήξεως, το σημείο ζέσεως, το σημείο ανάφλεξης και την εκρηξιμότητα (αν υπάρχει) της ουσίας.

Βλέπε επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Διάφορες ομάδες πειραματοζώων εκτίθενται καθημερινά, για μια ορισμένη περίοδο, σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις της εξεταζόμενης ουσίας, μια συγκέντρωση ανά ομάδα, για μια χρονική περίοδο 28 ημερών. Όταν χρησιμοποιείται φορέας για να βοηθήσει στην παραγωγή της κατάλληλης συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας, τότε πρέπει να χρησιμοποιείται και μια ομάδα μάρτυρας για το φορέα. Κατά τη διάρκεια της χορήγησης, πρέπει να γίνονται καθημερινές παρατηρήσεις στα ζώα, για τη διαπίστωση συμπτωμάτων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, όπως και αυτά που επιζούν στο τέλος της, πρέπει να νεκροτομούνται.

1.5. ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. Προετοιμασίες

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη του πειράματος. Πριν από τη δοκιμή υγιή, νεαρά ζώα ξεχωρίζονται τυχαία και κατανέμονται στις απαιτούμενες πειραματικές ομάδες. Ένας κατάλληλος φορέας μπορεί να προστεθεί στην εξεταζόμενη ουσία, όταν χρειαστεί, για να βοηθήσει την παραγωγή της κατάλληλης συγκέντρωσης της ουσίας στην ατμόσφαιρα. Αν ένας φορέας ή άλλες προσθετικές ουσίες χρησιμοποιούνται για να διευκολυνθεί η χορήγηση των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Ιστορικά στοιχεία, αν υπάρχουν, μπορεί να χρησιμοποιηθούν.

1.6.2. Πειραματικές συνθήκες

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Ο επίμυς είναι το είδος που προτιμάται, εκτός αν υπάρχουν αντενδείξεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται οι συνηθισμένες εργαστηριακές φυλές και νεαρά, υγιή ζώα.

Στην αρχή της μελέτης, το εύρος της διαφοράς βαρών των χρησιμοποιουμένων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της ενδεδειγμένης μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Για κάθε δοκιμαζόμενη ομάδα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά). Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων, ανά ομάδα, πρέπει να αυξηθεί με τον αριθμό των ζώων που έχουν προγραμματιστεί να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Επιπλέον, μία δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (πέντε ζώα κατά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το επίπεδο υψηλής συγκέντρωσης επί 28 ημέρες και να παρατηρηθεί σε σχέση με την αναστρεψιμότητα, εμμόνη ή όψιμη εμφάνιση τοπικών επιδράσεων επί 14 ημέρες μετά την αγωγή. Χρησιμοποιείται επίσης μία δορυφορική ομάδα από 10 ζώα μάρτυρες (πέντε ζώα κατά φύλο).

1.6.2.3. Συγκεντρώσεις έκθεσης

Απαιτούνται τουλάχιστον τρεις συγκεντρώσεις, με ένα μάρτυρα ή ένα μάρτυρα φορέα (που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του φορέα στην υψηλότερη δόση), αν χρησιμοποιείται φορέας. Τα ζώα στην ομάδα του μάρτυρα πρέπει να υφίστανται την ίδια μεταχείριση, της χορήγησης της εξεταζόμενης ουσίας εξαιρουμένης, με τα ζώα της εξεταζόμενης ομάδας. Η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις, αλλά καθόλου ή λίγους θανάτους. Η χαμηλότερη συγκέντρωση δεν πρέπει να προκαλεί ενδείξεις τοξικότητας. Όπου υπάρχει μια ευχερής εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, τότε η χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να την υπερβαίνει. Στην πιο ιδανική περίπτωση, η ενδιάμεση συγκέντρωση πρέπει να προκαλεί ελάχιστα, αλλά φανερά, τοξικά συμπτώματα. Αν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, τότε πρέπει να κατανέμονται έτσι που να παράγεται μια διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων. Στα κατώτερα και ενδιάμεσα επίπεδα συγκεντρώσεων, όπως και στους μάρτυρες, η συχνότητα των θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή, ώστε να επιτρέπεται μια σημαντική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

1.6.2.4. Χρόνος έκθεσης

Η διάρκεια της έκθεσης ανά ημέρα πρέπει να είναι 6 ώρες, αλλά και άλλες χρονικές περίοδοι μπορεί να απαιτηθούν σε ειδικές περιπτώσεις.

1.6.2.5. Συσκευές

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται μέσα σε μια αναπνευστική συσκευή σχεδιασμένη για να διατηρεί μια δυναμική ροή αέρα, τουλάχιστον 12 αλλαγών του αέρα ανά ώρα, ώστε να εξασφαλίζεται έτσι μια επάρκεια σε οξυγόνο και μια ομαλά κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης. Όπου χρησιμοποιείται θάλαμος, το σχήμα του πρέπει να μειώνει στο ελάχιστο το συνωστισμό των ζώων και να αυξάνει στο μεγαλύτερο βαθμό την αναπνευστική τους έκθεση στην εξεταζόμενη ουσία. Σαν γενικός κανόνας για να εξασφαλιστεί σταθερότητα στην ατμόσφαιρα ενός θαλάμου, ο ολικός «όγκος» των πειραματοζώων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του όγκου του δοκιμαστικού θαλάμου. Μπορεί να χρησιμοποιείται στοματορρινικός ή κεφαλικός, ή

ολόκληρου του σώματος ατομικός θάλαμος έκθεσης. Οι δύο πρώτοι θα μειώσουν στο ελάχιστο τη λήψη της ουσίας από άλλες οδούς.

1.6.2.6. Περίοδος παρατηρήσεων

Τα πειραματόζωα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά για συμπτώματα τοξικότητας σ' όλη τη διάρκεια της δοκιμής, όπως και κατά την περίοδο της θεραπείας. Ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των τοξικών συμπτωμάτων πρέπει να καταχωρούνται.

1.6.3. Διαδικασία

Τα ζώα εκτίθενται στην ελεγχόμενη ουσία καθημερινά 5 έως 7 ημέρες την εβδομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα κάθε δορυφορικής ομάδας, προγραμματισμένα για συνεχείς παρατηρήσεις, θα κρατηθούν για 14 επιπλέον ημέρες χωρίς χορήγηση της ουσίας, για να διαπιστωθεί η θεραπεία ή η εμμονή των τοξικών συμπτωμάτων. Η θερμοκρασία στην οποία πρέπει να πραγματοποιείται η δοκιμασία, πρέπει να διατηρείται στους $22\text{ C} \pm 3\text{ C}$.

Θεωρητικά, η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται μεταξύ 30% και 70%, σε ορισμένες όμως περιπτώσεις (π.χ. δοκιμές ορισμένων αεροζόλ) αυτό μπορεί να μην είναι πρακτικά δυνατό. Η διατήρηση ελαφράς αρνητικής πίεσης μέσα στο θάλαμο ($\leq 5\text{ mm}$ νερού) εμποδίζει τη διαφυγή της εξεταζόμενης ουσίας στον περιβάλλοντα χώρο. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης, δεν θα πρέπει να χορηγούνται τροφή και νερό.

Πρέπει να χρησιμοποιείται ένα δυναμικό αναπνευστικό σύστημα εφοδιασμένο με ένα κατάλληλο σύστημα μέτρησης της συγκέντρωσης. Για να διαπιστωθεί η κατάλληλη συγκέντρωση έκθεσης, συνιστάται μια προκαταρκτική δοκιμασία. Η ροή του αέρα πρέπει να προσαρμόζεται για να εξασφαλίζεται η ομοιογένεια των συνθηκών στο θάλαμο έκθεσης. Το σύστημα πρέπει να εξασφαλίζει την όσο το δυνατό γρηγορότερη αποκατάσταση σταθερών συνθηκών έκθεσης.

Θα πρέπει να γίνονται μετρήσεις ή παρακολούθηση:

(α) της ταχύτητας ροής του αέρα (συνεχώς).

(β) της πραγματικής συγκέντρωσης της εξεταζόμενης ουσίας στην αναπνευστική ζώνη. Κατά τη διάρκεια της ημερήσιας έκθεσης, η συγκέντρωση δεν θα πρέπει να κυμαίνεται περισσότερο του $\pm 15\%$ εκατέρωθεν της μέσης τιμής. Εντούτοις, στην περίπτωση ορισμένων αερολυμάτων, το επίπεδο αυτό ελέγχου μπορεί να μην είναι εφικτό οπότε μπορεί να γίνει αποδεκτή μία ευρύτερη ανοχή. Καθ' όλη τη μελέτη, οι συγκεντρώσεις μέρα προς μέρα θα πρέπει να κρατιούνται όσο το δυνατόν πιο σταθερές. Στα αερολύματα, θα πρέπει να εκτελείται ανά ομάδα κάθε εβδομάδα, μία τουλάχιστον ανάλυση μεγέθους σωματιδίων.

(γ) της θερμοκρασίας και της υγρασίας, συνεχώς αν είναι δυνατόν.

Κατά τη διάρκεια, και στη συνέχεια της έκθεσης, γίνονται συστηματικές παρατηρήσεις. Πρέπει να διατηρείται ατομικό αρχείο για κάθε ζώο. Όλα τα ζώα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά και τα συμπτώματα τοξικότητας πρέπει να καταγράφονται, περιλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης της σοβαρότητας και της διάρκειάς τους. Οι παρατηρήσεις πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στο δέρμα και στο τρίχωμα, αλλοιώσεις στα μάτια, στους βλεννογόνους, αλλοιώσεις στο αναπνευστικό, κυκλοφοριακό, στο αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται

εβδομαδιαία. Επίσης, συνιστάται να γίνονται μετρήσεις της κατανάλωσης της τροφής μια φορά την εβδομάδα. Οι τακτικές παρατηρήσεις των ζώων είναι απαραίτητες για να εξασφαλίζεται ότι τα ζώα δεν χάνονται από τη μελέτη για λόγους όπως ο καννιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών και η κακή τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου μελέτης, όλα τα επιζώντα στις μη δορυφορικές ομάδες νεκροτομούνται. Τα ετοιμοθάνατα ζώα και τα ζώα που παρουσιάζουν συμπτώματα έντονου πόνου και δυσφορίας θα πρέπει να απομακρύνονται μόλις αυτό γίνεται αντιληπτό, να θανατώνονται ανώδυνα και να νεκροτομούνται.

Οι ακόλουθες εξετάσεις πρέπει να γίνονται στο τέλος της δοκιμασίας σε όλα τα ζώα, των μαρτύρων συμπεριλαμβανομένων:

(i) αιματολογικές, που να περιλαμβάνουν, τουλάχιστον, το δείκτη αιματοκρίτη, συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης, μέτρηση ερυθροκυττάρων, μέτρηση λευκοκυττάρων και λευκοκυτταρικό τύπο και μια μέτρηση της πηκτικότητας του αίματος G

(ii) κλινικοί βιοχημικοί προσδιορισμοί στο αίμα, περιλαμβανομένης, τουλάχιστον, μιας παραμέτρου της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών: αλανίνο αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμίνη-πυροσταφυλική trans-αμινάση του ορού), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμινική οξαλοξική trans-αμινάση του ορού), άζωτο ουρίας, λεύκωμα, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες ορού.

λλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι απαραίτητοι για μια ικανοποιητική τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν: ασβέστιο, φωσφόρο, χλωριούχα, νάτριο, κάλιο, δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, ανάλυση λιπιδίων, ορμόνες, σχέση οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνη και δραστηριότητα χοληνεστεράσης.

Πρόσθετες κλινικές βιοχημικές δοκιμές μπορεί να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει ανάγκη επέκτασης της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

1.6.3.1 Νεκροψία

Όλα τα ζώα της μελέτης θα πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη νεκροψία. Τουλάχιστον το στήθος, τα νεφρά, τα επινεφρίδια, οι πνεύμονες και οι όρχεις θα πρέπει να ζυγίζονται ενώ όσο το δυνατόν γρηγορότερα μετά από την ανατομή, για να αποφεύγεται η ξήρανση. Τα όργανα και οι ιστοί (το αναπνευστικό σύστημα, το στήθος, τα νεφρά, η σπλήν, οι όρχεις, τα επινεφρίδια, η καρδιά και κάθε όργανο που εμφανίζει μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή αλλαγές στο μέγεθος) θα πρέπει να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσον για πιθανή μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση. Οι πνεύμονες θα πρέπει να απομακρύνονται άθικτοι, να ζυγίζονται και να υποβάλλονται σε κατεργασία με κατάλληλο στερεωτικό για να εξασφαλίζεται η συντήρηση της δομής των πνευμόνων.

1.6.3.2. Ιστοπαθολογική εξέταση

Στις ομάδες των υψηλών συγκεντρώσεων και στις ομάδες των μαρτύρων, πρέπει να γίνει ιστολογική εξέταση σε συντηρημένα όργανα και ιστούς. Όργανα και ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες στην υψηλότερη δόση και που μπορούν να αποδοθούν στην ελεγχόμενη ουσία, πρέπει να εξετάζονται σε όλες τις ομάδες των χαμηλότερων δόσεων. Τα ζώα καθ' δορυφορική ομάδα πρέπει να εξετάζονται ιστολογικά, με ιδιαίτερη έμφαση σ'εκείνα τα όργανα και ιστούς που εμφάνισαν επιδράσεις στα ζώα των άλλων ομάδων.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε ομάδα δοκιμής, ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμής και ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν κάθε τύπο αλλοίωσης.

Όλα τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν πρέπει να αξιολογηθούν με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατό, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

- είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή κλπ. G

- πειραματικές συνθήκες:

περιγραφή της συσκευής έκθεσης συμπεριλαμβανομένου του σχεδίου, του τύπου, των διαστάσεων, της πηγής του αέρα, του συστήματος παραγωγής αερολυμάτων, της μεθόδου κλιματισμού του αέρα, της κατεργασίας του εξερχόμενου αέρα και της μεθόδου στέγασης των ζώων στο δοκιμαστικό θάλαμο, που χρησιμοποιείται. Θα πρέπει να περιγράφεται η διάταξη μέτρησης της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, όπου χρειάζεται, της σταθερότητας των συγκεντρώσεων ή κατανομής μεγέθους σωματιδίων των αερολυμάτων.

Δεδομένα έκθεσης:

Αυτά θα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα και να παρουσιάζονται με μέσες τιμές και μέτρηση μεταβλητότητας (π.χ. τυπική απόκλιση) και θα περιλαμβάνουν, αν είναι δυνατόν:

α) ταχύτητες αέρα από τη συσκευή αναπνευστικής έκθεσης G

β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα G

γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (ολικό ποσό της εξεταζόμενης ουσίας που τροφοδοτεί τη συσκευή, διαιρεμένο με τον όγκο του αέρα) G

δ) φύση φορέα, εάν χρησιμοποιείται G

ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στην πειραματική αναπνευστική ζώνη G

στ) τη μέση αεροδυναμική διάμετρο μάζας (ΜΑΔΜ) και τη γεωμετρική τυπική απόκλιση (ΓΤΑ) G

- δεδομένα τοξικών αντιδράσεων ανά φύλο και συγκέντρωση G

- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή, εάν τα ζώα επέζησαν, στο τέλος της δοκιμής G

- περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων, δόσεις χωρίς επίδραση G

- το χρόνο παρατήρησης κάθε ανώμαλου συμπτώματος και την επακόλουθη πορεία του G
- δεδομένα βάρους τροφής και σώματος G
- χρησιμοποιηθείσες αιματολογικές εξετάσεις και αποτελέσματα G
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα G
- αποτελέσματα νεκροψίας G
- μια λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων που βρέθηκαν G
- μια στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό G
- συζήτηση των αποτελεσμάτων G
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

B.9. ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ (28 ΗΜΕΡΕΣ) ΔΟΣΗΣ (ΔΕΡΜΑΤΙΚΗ)

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Α).

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή, Μέρος Β (Β).

1.3. ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία.

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξεταζόμενη ουσία εφαρμόζεται καθημερινά στο δέρμα σε διαβαθμισμένες δόσεις, σε διάφορες ομάδες πειραματοζώων, μία δόση ανά ομάδα, για μια χρονική περίοδο 28 ημερών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εφαρμογής, τα ζώα εξετάζονται καθημερινά για τη διαπίστωση τοξικών συμπτωμάτων. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμής, όπως και αυτά που επιζούν στη λήξη της, νεκροτομούνται.

1.5. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Ουδέν.

1.6. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.6.1. Προετοιμασίες

Τα ζώα κρατούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες εγκλωβισμού και διατροφής για 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμή υγιή, νεαρά ζώα ξεχωρίζονται τυχαία και κατανέμονται στις πειραματικές ομάδες και τις ομάδες μαρτύρων. Λίγο πριν αρχίσει η δοκιμή το τρίχωμα ψαλιδίζεται από την περιοχή της ράχης του κορμού των πειραματοζώων. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί το ξύρισμα για την απομάκρυνση του τριχώματος, αλλά αυτό πρέπει να γίνεται 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμή. Επανάληψη του ψαλιδίσματος ή του ξυρίσματος χρειάζεται συνήθως κάθε εβδομάδα. Το ψαλίδισμα ή ξύρισμα πρέπει να γίνεται με προσοχή, ώστε να αποφεύγεται η απόξεση του δέρματος. Πρέπει να καθαρίζεται μια περιοχή για την εφαρμογή της εξεταζόμενης ουσίας, η οποία δεν πρέπει να είναι μικρότερη από το 10% της επιφάνειας του σώματος. Όταν αποφασίζονται οι διαστάσεις της περιοχής που πρέπει να καθαριστεί και να καλυφθεί με την εξεταζόμενη ουσία, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το βάρος του ζώου. Όταν ελέγχονται στερεά, τα οποία μπορούν να κονιοποιηθούν, πρέπει να υγραίνονται αρκετά με νερό ή αν χρειαστεί με κατάλληλο φορέα, για να εξασφαλιστεί η καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως αδιάλυτες. Η εφαρμογή γίνεται καθημερινά 5 έως 7 ημέρες την εβδομάδα.

1.6.2. Πειραματικές συνθήκες

1.6.2.1. Πειραματόζωα

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενήλικας επίμυς, κουνέλι ή ινδικό χοιρίδιο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, η χρήση τους όμως απαιτεί αιτιολόγηση.

Στην αρχή της μελέτης, το εύρος της διαφοράς βαρών των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της ενδεδειγμένης μέσης τιμής.

1.6.2.2. Αριθμός και φύλο

Σε κάθε επίπεδο δόσεων πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10 ζώα (5 θηλυκά και 5 αρσενικά) με υγιές δέρμα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Εάν έχουν προγραμματιστεί ενδιάμεσες θανατώσεις ζώων, τότε ο αριθμός των ζώων ανά ομάδα πρέπει να αυξηθεί με τον αριθμό των ζώων που είναι προγραμματισμένο να θανατωθούν πριν από τη συμπλήρωση της μελέτης. Επιπλέον, μια δορυφορική ομάδα από 10 ζώα (5 ζώα ανά φύλο) μπορεί να εκτεθεί στην υψηλότερη δόση για 28 ημέρες και να εξετασθεί για επαναφορά, εμμονή ή αργοπορημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για ένα χρονικό διάστημα 14 ημερών μετά το πέρας της δηλητηρίασης. Χρησιμοποιείται επίσης και μία δορυφορική ομάδα από 10 ζώα μάρτυρες (πέντε ζώα κατά φύλο).

1.6.2.3. Επίπεδα δόσεων

Απαιτούνται τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή ένας μάρτυρας του φορέα, αν χρησιμοποιείται φορέας. Η περίοδος έκθεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα. Η εφαρμογή της ελεγχόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται την ίδια ώρα κάθε μέρα και να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (μια ή δύο φορές την εβδομάδα), έτσι ώστε να διατηρείται ένα σταθερό επίπεδο δόσεων σε σχέση με το βάρος του σώματος των ζώων. Τα ζώα στην ομάδα του μάρτυρα πρέπει να υπόκεινται στην ίδια μεταχείριση με τα πειραματόζωα, εξαιρουμένης της εφαρμογής της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν χρησιμοποιείται φορέας για διευκόλυνση της χορήγησης της δόσης, η ομάδα του μάρτυρα πρέπει να παίρνει τη δόση κατά τον ίδιο τρόπο με την ομάδα των πειραματόζωων και η ποσότητα της δόσης να είναι ίδια με την υψηλότερη δόση που παίρνουν τα πειραματόζωα. Η υψηλότερη δόση θα πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις, αλλά λίγους ή καθόλου θανάτους. Η χαμηλότερη δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί συμπτώματα τοξικότητας. Όταν υπάρχει μια ευχερής εκτίμηση της ανθρώπινης έκθεσης, η χαμηλότερη δόση θα πρέπει να την υπερβαίνει. Η ενδιάμεση δόση, στην πιο ιδανική περίπτωση, θα πρέπει να προκαλεί ελάχιστα ευδιάκριτα τοξικά συμπτώματα. Εάν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τότε αυτές πρέπει να απέχουν έτσι μεταξύ τους ώστε να προκαλούν διαβαθμισμένες τοξικές επιδράσεις. Στις χαμηλές και στις ενδιάμεσες ομάδες, όπως και στους μάρτυρες, η συχνότητα των θανάτων θα πρέπει να είναι χαμηλή, ώστε να επιτρέπει μια χρήσιμη αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Εάν η εφαρμογή της εξεταζόμενης ουσίας προκαλεί σοβαρό δερματικό ερεθισμό, οι συγκεντρώσεις θα πρέπει να ελαττωθούν και αυτό μπορεί να ελαττώσει ή να εξαφανίσει τις άλλες τοξικές επιδράσεις στην υψηλότερη δόση. Επιπλέον, αν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, είναι δυνατόν να χρειαστεί, να ακυρωθεί η μελέτη και να επιχειρηθεί ένα νέο πείραμα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

1.6.2.4. Οριακή δοκιμή

Αν μια προκαταρκτική μελέτη με μια δόση 1 000 mg/kg ή και μεγαλύτερη, σχετική με το πιθανό όριο έκθεσης του ανθρώπινου πληθυσμού, εάν είναι γνωστό, δεν προκαλεί καμμία τοξική επίδραση, ο περαιτέρω πειραματισμός μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαίος.

1.6.2.5. Περίοδος παρατήρησης

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για φαινόμενα τοξικότητας. Ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος κατά τον οποίο εμφανίζονται και εξαφανίζονται τα τοξικά συμπτώματα πρέπει να καταγράφονται.

1.6.3. Διαδικασία

Τα ζώα πρέπει να εγκλωβίζονται μεμονωμένα. Η επέμβαση στα ζώα με την εξεταζόμενη ουσία γίνεται, στην πιο ιδανική περίπτωση, 7 ημέρες την εβδομάδα, για μια περίοδο 28 ημερών. Τα ζώα κάθε δορυφορικής ομάδας που προγραμματίστηκαν για συνεχείς παρατηρήσεις πρέπει να διατηρηθούν για 14 επιπλέον ημέρες χωρίς επέμβαση, για να εξακριβωθεί η ανάρρωση από τις τοξικές επιδράσεις ή η εμμονή τους. Ο χρόνος έκθεσης πρέπει να είναι τουλάχιστον 6 ώρες την ημέρα.

Η εξεταζόμενη ουσία πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε μια έκταση, η οποία είναι περίπου το 10% της όλης επιφάνειας του σώματος. Με πολύ τοξικές ουσίες η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά όσο γίνεται περισσότερη από την επιφάνεια πρέπει να καλύπτεται με μία λεπτή και ομοιόμορφη στοιβάδα ουσίας.

Η εξεταζόμενη ουσία, κρατιέται σ' επαφή με το δέρμα κατά τη διάρκεια της έκθεσης, με τη βοήθεια επίδεσμου από πορώδη γάζα και μιας μη ερεθιστικής ταινίας. Η δοκιμαζόμενη περιοχή πρέπει, επιπλέον, να καλύπτεται κατάλληλα, ώστε να συγκρατείται ο επίδεσμος και η εξεταζόμενη ουσία και έτσι να εξασφαλίζεται η μη κατάποσή της από τα πειραματόζωα. Για να αποφευχθεί η κατάποση της εξεταζόμενης ουσίας, μπορεί να χρησιμοποιούνται επίσης συσκευές περιορισμού των ζώων, αλλά δεν συνιστάται η μέθοδος της απόλυτης ακινησίας. Ως εναλλακτική λύση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα «προστατευτικό κολλάρο».

Η ουσία που μένει σαν υπόλειμμα, στο τέλος της περιόδου έκθεσης, θα πρέπει να απομακρύνεται όταν αυτό είναι δυνατό με νερό ή άλλη κατάλληλη μέθοδο καθαρισμού του δέρματος.

Όλα τα πειραματόζωα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά και να καταγράφονται τα τοξικά συμπτώματα, ο χρόνος έναρξής τους, ο βαθμός και η διάρκειά τους. Οι παρατηρήσεις πρέπει να περιλαμβάνουν αλλοιώσεις στο δέρμα και στο τρίχωμα, στα μάτια και στους βλεννογόνους, όπως επίσης στο αναπνευστικό, κυκλοφοριακό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στον τρόπο συμπεριφοράς. Πρέπει, επίσης, να γίνονται μετρήσεις της κατανάλωσης τροφής και του βάρους των ζώων μια φορά την εβδομάδα. Η κανονική παρατήρηση των ζώων είναι απαραίτητη για να εξασφαλίζεται ότι δεν υπάρχει απώλεια πειραματοζώων εξαιτίας καννιβαλισμού, αυτόλυσης των ιστών ή κακής στέγασης. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες νεκροτομούνται. Τα ετοιμοθάνατα ζώα και τα ζώα που παρουσιάζουν συμπτώματα έντονου πόνου και δυσφορίας θα πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνεται αντιληπτό, να θανατώνονται ανώδυνα και να νεκροτομούνται.

Οι παρακάτω εξετάσεις θα πρέπει να γίνουν στο τέλος της δοκιμής σε όλα τα ζώα, των μαρτύρων συμπεριλαμβανομένων:

1) αιματολογικές που να περιλαμβάνουν τουλάχιστον μετρήσεις αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης, μετρήσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών και λευκοκυτταρικού τύπου, και μια μέτρηση της

πηκτικότητας του αίματος G

2) κλινικές βιοχημικές μετρήσεις του αίματος που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μια παράμετρο της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών: αλανίνο αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμίνη-πυροσταφυλική trans-αμινάση του ορού), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση του ορού (αρχικά γνωστή σαν γλουταμινική οξαλοξική trans-αμινάση του ορού), άζωτο ουρίας, αλβουμίνη, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες του ορού.

Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι αναγκαίοι για την τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν: ασβέστιο, φωσφόρο, χλώριο, νάτριο, κάλιο, δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, ανάλυση λιπιδίων, ορμονών, ισορροπία οξέων/βάσεων, μεθαιμοσφαιρίνη και δραστηριότητα χολινεστεράσης.

Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και άλλοι βιοχημικοί προσδιορισμοί για την επέκταση της έρευνας των παρατηρηθεισών επιδράσεων.

1.6.4. Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα της μελέτης πρέπει να υποβληθούν σε μία πλήρη μακροσκοπική νεκροψία. Το σκύωτι, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγιστούν νωπά, όσο το δυνατό γρηγορότερα μετά την ανατομή για την αποφυγή αποξήρανσης. Τα όργανα και οι ιστοί, δηλ. φυσιολογικό και εκτεθειμένο δέρμα, σκύωτι, νεφρά, σπλήνα, όρχεις, επινεφρίδια, καρδιά και όργανα στόχοι (δηλαδή τα όργανα εκείνα που εμφανίζουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις ή μεταβολές μεγέθους) θα πρέπει να διατηρούνται σ'ένα κατάλληλο μέσο για την πιθανή, μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση.

1.6.5. Ιστοπαθολογική εξέταση

Η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να γίνεται στα διατηρηθέντα όργανα των ζώων της ομάδας της υψηλότερης δόσης και των μαρτύρων. Τα όργανα και οι ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες, που μπορεί να αποδοθούν στην υψηλότερη δόση της εξεταζόμενης ουσίας, πρέπει να εξετάζονται και σ' όλες τις ομάδες χαμηλοτέρων δόσεων. Τα ζώα της δορυφορικής ομάδας πρέπει να εξετάζονται ιστολογικά με ιδιαίτερη έμφαση για κείνα τα όργανα που διαπιστώθηκε ότι δείχνουν ανωμαλίες στις άλλες ομάδες.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο να φαίνεται, για κάθε πειραματική ομάδα, ο αριθμός των ζώων που εμφανίζουν κάθε τύπο αλλοίωσης.

Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με μια κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει, αν είναι δυνατόν, να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες:

- δεδομένα ζώων (είδος, φυλή, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διατροφή, κλπ.) G

- πειραματικές συνθήκες (συμπεριλαμβανομένου και του τύπου του επιδέσμου: προσροφητικού ή μη προσροφητικού) G
- επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του φορέα, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις G
- μη τοξικά επίπεδα, όταν είναι δυνατόν G
- δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο G
- χρόνο θανάτου των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης ή αν τα ζώα επιζούν έως το τέλος G
- τοξικές ή άλλες επιδράσεις G
- το χρόνο που παρατηρήθηκε κάθε ανωμαλία και τη διαδοχική πορεία τους G
- δεδομένα βάρους σώματος και κατανάλωσης τροφής G
- αιματολογικές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα G
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν και αποτελέσματα G
- ευρήματα νεκροψίας G
- λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων G
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό G
- συζήτηση των αποτελεσμάτων G
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Δ).

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βλέπε Γενική Εισαγωγή Μέρος Β (Ε).

B. 10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ – *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ

ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντηγραφή της OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της *in vitro* δοκιμής χρωμοσωμικών εκτροπών είναι ο εντοπισμός παραγόντων που προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών (1)(2)(3). Οι δομικές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Τα περισσότερα χημικά μεταλλάξογόνα προκαλούν εκτροπές χρωματιδικού τύπου, απαντώνται όμως και εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου. Τυχόν αύξηση στην πολυπλοειδία μπορεί να σημαίνει ότι μία χημική ουσία έχει τη δυνατότητα να επάγει αριθμητικές εκτροπές. Εντούτοις, η παρούσα μέθοδος δεν έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση αριθμητικών εκτροπών και δεν χρησιμοποιείται συνήθως για το σκοπό αυτό. Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα αποτελούν αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών του ανθρώπου και υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις ότι οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα που προκαλούν αλλοιώσεις σε ογκογονίδια και ογκογενή αποκαταστατικά γονίδια σωματικών κυττάρων σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου σε ανθρώπους και σε πειραματόζωα.

Στην *in vitro* δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες καθιερωμένων κυτταρικών σειρών, κυτταρικών στελεχών ή καλλιέργειες αρχέγονων κυττάρων. Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα επιλέγονται με βάση την ικανότητα ανάπτυξής τους στην καλλιέργεια, τη σταθερότητα του καρυοτύπου, τον αριθμό των χρωμοσωμάτων, την ποικιλότητα των χρωμοσωμάτων και την αυθόρμητη συχνότητα χρωμοσωμικών εκτροπών.

Οι δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτούν εν γένει τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το σύστημα αυτό μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μπορεί να μιμηθεί εξ ολοκλήρου τις *in vivo* συνθήκες των θηλαστικών. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να αποφεύγεται η χρήση συνθηκών που μπορεί να οδηγήσουν στη λήψη θετικών αποτελεσμάτων τα οποία μπορεί να μην οφείλονται σε εγγενή μεταλλάξογενετικότητα αλλά να προέρχονται από αλλαγές στο pH, την ωσμωμοριακότητα ή υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (4)(5).

Η παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πιθανών μεταλλάξογόνων και καρκινογόνων ουσιών στα θηλαστικά. Πολλές ενώσεις που εμφανίζονται θετικές στην παρούσα δοκιμή είναι καρκινογόνες για τα θηλαστικά. Δεν υπάρχει όμως απόλυτη συσχέτιση μεταξύ αυτής της δοκιμής και του φαινομένου της καρκινογενετικότητας. Η συσχέτιση εξαρτάται από τη χημική τάξη και υπάρχουν αύξουσες ενδείξεις ότι υπάρχουν καρκινογόνα που δεν ανιχνεύονται από τη δοκιμή αυτή γιατί δρουν μέσω μηχανισμών που δεν έχουν σχέση με άμεση βλάβη του DNA.

Βλ. επίσης Γενική εισαγωγή Μέρους Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματιδών ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματιδών.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη, ή ρήξη και επανένωση, και των δύο χρωματιδών στην ίδια θέση.

Ενδοαναδιπλασιασμός: διεργασία κατά την οποία έπεται από μία S φάση αντιγραφής DNA, ο πυρήνας δεν υφίσταται μίτωση αλλά ξεκινά μία νέα S φάση. Το αποτέλεσμα είναι χρωμοσώματα με 4, 8, 16, ... χρωματίδες.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδας και με ελάχιστη απευθυγράμμιση των χρωματιδών.

Μιτωτικός δείκτης: ο λόγος των κυττάρων σε μετάφαση δια του συνολικού αριθμού των κυττάρων που παρατηρούνται σε ένα κυτταρικό πληθυσμό · αποτελεί ένδειξη του βαθμού πολλαπλασιασμού του πληθυσμού αυτού.

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιούμενων κυττάρων.

Πολλαπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (n) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλ. 3n, 4n κ.ο.κ).

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που εντοπίζεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο του σταδίου της μεταφάσεως της διαίρεσης των κυττάρων και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ενδοανταλλαγών ή ανταλλαγών.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΙΣ

Κυτταρικές καλλιέργειες εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Σε προκαθορισμένα διαστήματα μετά την έκθεση των κυτταρικών καλλιεργειών στην υπό δοκιμή ουσία, αυτές υποβάλλονται σε κατεργασία με μία ουσία αναστολής της μετάφασης (π.χ. Colcemid® ή κολχικίνη), συλλέγονται, χρωματίζονται και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται με μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν χρωμοσωμικές εκτροπές.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΙΣ

1.4.1 Προετοιμασίες

1.4.1.1 Κύτταρα

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες κυτταρικές σειρές, στελέχη ή καλλιέργειες αρχέγονων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και ανθρώπινων κυττάρων (π.χ. ινοβλάστες κινέζικων κρικητών, ανθρώπινα περιφερικά λεμφοκύτταρα ή λεμφοκύτταρα άλλων θηλαστικών).

1.4.1.2 Μέσο και συνθήκες καλλιέργειας

Για τις καλλιέργειες πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλο μέσο καλλιέργειας και συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, συγκέντρωση CO₂, θερμοκρασία και υγρασία). Οι καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη πρέπει να ελέγχονται σε τακτική βάση ως προς τη σταθερότητα του υποθετικού χρωμοσωμικού αριθμού και την απουσία μόλυνσης από μυκόπλασμα και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται εφόσον έχουν μολυνθεί. Θα πρέπει να είναι γνωστός ο κανονικός χρόνος του κυτταρικού κύκλου για τα κύτταρα και τις χρησιμοποιούμενες συνθήκες καλλιέργειας.

1.4.1.3 *Ετοιμασία των καλλιιεργειών*

Καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και στελέχη: κύτταρα πολλαπλασιάζονται από έτοιμες καλλιέργειες ανακαλλιιεργούνται σε μέσο καλλιέργειας με πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη φθάνουν σε κατάσταση συρροής πριν από το χρόνο συλλογής και επωάζονται στους 37°C.

Λεμφοκύτταρα: πλήρες αίμα κατεργασμένο με ένα αντιθρομβωτικό (π.χ. ηπαρίνη) ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα ληφθέντα από υγιή υποκείμενα προστίθενται στο μέσο καλλιέργειας που περιέχει ένα μιτωγόνο (π.χ. φυτοαίμοσυγκολλητίνη) και επωάζονται στους 37°C.

1.4.1.4 *Μεταβολική ενεργοποίηση*

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία κατάλληλου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνθετικότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπαράγοντα (S9) που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως : Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9) ή μίγμα φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (10)(11)(12).

Το μεταμιτοχονδριακό κλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 1-10% v/v στο τελικό μέσο δοκιμής. Η κατάσταση ενός συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης μπορεί να εξαρτάται από την τάξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία συγκεντρώσεις μεταμιτοχονδριακού κλάσματος.

Με ορισμένες αλλαγές, στις οποίες περιλαμβάνεται και η παρασκευή επεξεργασμένων με μεθόδους γενετικής μηχανικής κυτταρικών σειρών που εκφράζουν ειδικά ενεργοποιητικά ένζυμα, ενδέχεται να μπορεί να γίνει και ενδογενής ενεργοποίηση. Η επιλογή των χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικώς (π.χ. από τη σχέση του κυτοχρωμικού P450 ισοενζύμου με το μεταβολισμό της υπό δοκιμή ουσίας).

1.4.1.5 *Υπό δοκιμή ουσία/Προετοιμασία*

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον απαιτείται, πριν από την κατεργασία των κυττάρων. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα συστήματα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την κατεργασία. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στοιχεία επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2 **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1 *Διαλύτης/φορέας*

Δεν πρέπει να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του διαλύτη/φορέα με την υπό δοκιμή ουσία ενώ αυτός θα πρέπει να είναι συμβατός με την επιβίωση των κυττάρων και τη δραστηριότητα S9. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι από τους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας. Όταν εξετάζονται ουσίες που δεν είναι σταθερές στο νερό, οι χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι ύδατος. Το νερό μπορεί να αφαιρεθεί με την προσθήκη μοριακού κοσκίνου.

1.4.2.2 Συγκεντρώσεις εκθέσεων

Μεταξύ των κριτηρίων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν καθορίζεται η μέγιστη προς χρήση συγκέντρωση είναι η κυτταροτοξικότητα, η διαλυτότητα στο σύστημα δοκιμής και οι μεταβολές στο pH ή την οσμωμοριακότητα.

Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση στο κύριο πείραμα χρησιμοποιώντας προς τούτο μία κατάλληλη ένδειξη της ακεραιότητας και ανάπτυξης των κυττάρων όπως ο βαθμός συρροής, ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων ή ο μιτωτικός δείκτης. Χρήσιμο μπορεί να είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας και διαλυτότητας να γίνει σε ένα προκαταρκτικό πείραμα.

Για την ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις. Εφόσον εμφανίζονται φαινόμενα κυτταροτοξικότητας, οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι μικρή ή και μηδενική τοξικότητα. Αυτό σημαίνει συνήθως ότι οι συγκεντρώσεις δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από ένα συντελεστή μεταξύ 2 και $\sqrt{10}$. Κατά το χρόνο της συλλογής, η μέγιστη συγκέντρωση θα πρέπει να εμφανίζει σημαντική μείωση στο βαθμό συρροής, τον αριθμό των κυττάρων ή το μιτωτικό δείκτη (όλα περισσότερο από 50%). Ο μιτωτικός δείκτης αποτελεί έμμεση μόνο μέτρηση των κυτταροτοξικών/κυτταροστατικών αποτελεσμάτων και εξαρτάται από το χρόνο που μεσολάβησε από την καταργασία. Εντούτοις, ο μιτωτικός δείκτης είναι αποδεκτός για καλλιέργειες μορφής εναιωρήματος για τις οποίες άλλες μετρήσεις τοξικότητας μπορεί να είναι άβολες και μη πρακτικές. Στοιχεία σχετικά με την κινητική του κυτταρικού κύκλου, όπως ο μέσος χρόνος γενεάς (MXΓ), μπορούν να χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές πληροφορίες. Εντούτοις, ο MXΓ είναι μία γενική μέση τιμή που δεν αποκαλύπτει πάντοτε την ύπαρξη καθυστερημένων υποπληθυσμών, ακόμη δε και πολύ μικρές αυξήσεις στο μέσο χρόνο γενεάς μπορούν να συνδέονται με πολύ σημαντική καθυστέρηση στο χρόνο της άριστης ανάπτυξης των εκτροπών.

Για σχετικά μη κυτταροτοξικές ουσίες, η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml or 0.01 M, όποια από τις τρεις είναι χαμηλότερη.

Για σχετικά αδιάλυτες ουσίες που δεν είναι τοξικές σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας, η μέγιστη χρησιμοποιούμενη δόση θα πρέπει να αντιστοιχεί σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από το όριο διαλυτότητας στο τελικό μέσο καλλιέργειας στο τέλος της περιόδου κατεργασίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. όταν φαινόμενα τοξικότητας εμφανίζονται μόνο σε υψηλότερες από τη χαμηλότερη συγκέντρωση μέγιστης διαλυτότητας) συνιστάται να διεξάγεται δοκιμή σε περισσότερες από μία συγκεντρώσεις με ορατή πτώση ιζήματος. Μπορεί να είναι χρήσιμο να εκτιμηθεί η διαλυτότητα στην αρχή και το πέρας της κατεργασίας καθώς η διαλυτότητα μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο σύστημα δοκιμής λόγω της παρουσίας κυττάρων, S9, ορού, κλπ. Η μέγιστη διαλυτότητα μπορεί να ανιχνευθεί με γυμνό οφθαλμό. Το ίζημα δεν πρέπει να παρεμβαίνει στην εκτίμηση αυτή.

1.4.2.3 Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες

Σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Όταν χρησιμοποιείται μεταβολική ενεργοποίηση, ως θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται ουσία που απαιτεί ενεργοποίηση για την παροχή μεταλλαξογόνου απόκρισης.

Ως θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται γνωστά κλαστογόνα σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν αναπαραγώγιμη και ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο που αποδεικνύει την ευαισθησία του συστήματος δοκιμής.

Οι συγκεντρώσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

Κατάσταση μεταβολικής ενεργοποίησης	Ουσία	Λιθ. CAS	Λιθ. EINECS
Απουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3	200-625-0
	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
	Λιθιο νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
	Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
	4-Νιτροκινολιν-Ν--οξείδιο	56-57-5	200-281-1
Παρουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	Βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
	Κυκλοφωσφamide	50-18-0	200-015-4
	Μονοένυδρο κυκλοφωσφamide	6055-19-2	

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες κατάλληλες ουσίες. Εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα χρήσης ως θετικών μαρτύρων ουσιών σχετικής χημικής τάξης

Σε κάθε συλλογή, θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, αποτελούμενοι από μόνο τον διαλύτη ή φορέα στο μέσο κατεργασίας και κατεργασμένοι με τον ίδιο τρόπο με εκείνο των καλλιεργειών της υπό δοκιμή ουσίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποστάντες κατεργασία μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν πρότερα στοιχεία που καταδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξογόνα αποτελέσματα.

1.4.3 Διαδικασία

1.4.3.1 Κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία

Πολλαπλασιασμένα κύτταρα υποβάλλονται σε κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Η κατεργασία των λεμφοκυττάρων πρέπει να αρχίζει 48 ώρες περίπου μετά τη μιτωγόνο διέγερση.

1.4.3.2

Για κάθε συγκέντρωση θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες εις διπλούν, ενώ το ίδιο συνιστάται ένθερμα και για τις αρνητικές/με διαλύτη καλλιέργειες. Όταν από πρότερα κριστάμενα στοιχεία μπορεί να αποδειχθεί ότι η διαφοροποίηση μεταξύ των διπλών καλλιεργειών είναι ελάχιστη (13)(14), μπορεί να γίνει δεκτή η χρήση μιας μόνης καλλιέργειας για κάθε συγκέντρωση.

Οι αέριες ή πτητικές ουσίες πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με κατάλληλες μεθόδους όπως π.χ. σε σφραγισμένα δοχεία καλλιεργειών (15)(16).

1.4.3.3 Χρόνος συλλογής καλλιέργειας

Στο πρώτο πείραμα, τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, για 3-6 ώρες και να λαμβάνεται δείγμα έπειτα από χρονικό διάστημα που αντιστοιχεί με το 1,5 περίπου της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου μετά την έναρξη της κατεργασίας (12). Εάν το πρωτόκολλο αυτό δίνει αρνητικά αποτελέσματα, τόσο με όσο και χωρίς ενεργοποίηση, θα πρέπει να διεξάγεται μία πρόσθετη δοκιμή χωρίς ενεργοποίηση, με συνεχή κατεργασία μέχρι τη δειγματοληψία σε χρόνο που ισοδυναμεί με το 1,5 περίπου της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου. Ορισμένες ουσίες μπορεί να ανιχνεύονται ευκολότερα όταν ο χρόνος κατεργασίας/δειγματοληψίας είναι μεγαλύτερος από το 1,5 της διάρκειας του κύκλου. Τα αρνητικά αποτελέσματα με μεταβολική ενεργοποίηση πρέπει να επιβεβαιώνονται περίπτωση προς περίπτωση. Στις περιπτώσεις όπου δεν κρίνεται αναγκαία η επιβεβαίωση των αρνητικών αποτελεσμάτων, αυτό θα πρέπει να αιτιολογείται.

1.4.3.4 Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων

Κυτταρικές καλλιέργειες υποβάλλονται σε κατεργασία με Colcemid® ή κολχικίνη για μία έως τρεις ώρες συνήθως πριν από τη συλλογή. Κάθε κυτταρική καλλιέργεια συλλέγεται και υποβάλλεται σε χωριστή επεξεργασία για την προετοιμασία των χρωμοσωμάτων. Η προετοιμασία των χρωμοσωμάτων περιλαμβάνει κατεργασία των κυττάρων με υπότονο διάλυμα, στερέωση και χρώση.

1.4.3.5 Ανάλυση

Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να παίρνουν ένα ξεχωριστό κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Επειδή οι διαδικασίες στερέωσης απολήγουν συχνά στη ρήξη ενός μέρους των μεταφασικών κυττάρων με απώλεια χρωμοσωμάτων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει συνεπώς να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων ίσο με τον υποθετικό αριθμό ± 2 για όλα τα είδη κυττάρων. Θα πρέπει να καταμετρούνται τουλάχιστον 200 καλώς ανεπτυγμένες μεταφάσεις ανά συγκέντρωση και μάρτυρα, μοιρασμένες εξ ίσου μεταξύ των εις διπλούν καλλιιεργειών, εφόσον γίνεται. Ο αριθμός αυτός μπορεί να μειωθεί όταν παρατηρείται υψηλός αριθμός εκτροπών.

Αν και σκοπός της δοκιμής είναι να ανιχνευθούν χρωμοσωμικές εκτροπές, είναι σημαντικό το να καταγραφούν τυχόν φαινόμενα πολυπλοειδίας και ενδοαναδιπλασιασμού, εφόσον παρατηρηθούν.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η πειραματική μονάδα είναι το κύτταρο, επομένως θα πρέπει να υπολογίζεται το ποσοστό των κυττάρων με δομική ή δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών μεταβολών θα πρέπει να καταγράφονται με τον αριθμό και τη συχνότητά που εμφανίζονται στις πειραματικές και μαρτυρικές καλλιέργειες. Τα χάσμα καταγράφονται ξεχωριστά και περιλαμβάνονται στην έκθεση, γενικά όμως δεν περιλαμβάνονται στη συνολική συχνότητα εκτροπών.

Θα πρέπει επίσης να καταγράφονται και οι παράλληλες μετρήσεις κυτταροτοξικότητας για όλες τις υποβληθείσες σε κατεργασία καθώς και τις αρνητικές μαρτυρικές καλλιέργειες στα κύρια πειράματα εκτροπής.

Θα πρέπει να δίνονται στοιχεία για κάθε καλλιέργεια χωριστά. Επιπλέον, όλα τα στοιχεία θα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών αποκρίσεων. Τυχόν διαφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να αποσαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας κατά προτίμηση τις πειραματικές συνθήκες. Η ανάγκη επιβεβαίωσης των αρνητικών αποτελεσμάτων έχει συζητηθεί στο σημείο 1.4.3.3. Στα επαναληπτικά πειράματα θα πρέπει να εξετάζεται η τροποποίηση των παραμέτρων της δοκιμής ώστε να καλύπτουν όλη την έκταση των εκτιμώμενων συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιηθούν περιλαμβάνεται το εύρος των συγκεντρώσεων και οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό υπάρχουν διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση αύξηση ή η αναπαραγωγική αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (3)(13). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Τυχόν αύξηση στον αριθμό των πολυπλοειδών κυττάρων μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να αναστέλλει τις μιτωτικές διεργασίες και να επάγει αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Τυχόν αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με ενδοαναδιπλασιασμένα χρωμοσώματα μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να εμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (17)(18).

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξογόνος στο σύστημα αυτό.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν την εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστηριότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διαφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vitro* δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα σωματικά κύτταρα θηλαστικών. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές σε καλλιεργημένα σωματικά κύτταρα θηλαστικών.

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΙΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/Φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές,

Κύτταρα:

- τύπο και πηγή των κυττάρων,
- χαρακτηριστικά καρυοτύπου και καταλληλότητα του χρησιμοποιηθέντος τύπου κυττάρων,
- απουσία μυκοπλάσματος, εφόσον συντρέχει περίπτωση
- πληροφορίες για τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου,
- φύλο των δωρητών αίματος, πλήρες αίμα ή διαχωρισμένα λεμφοκύτταρα, χρησιμοποιηθέν μιτωγόνο,
- αριθμό διελεύσεων, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μεθόδους συντήρησης της κυτταρικής καλλιέργειας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- υποθετικό αριθμό χρωμοσωμάτων.

Συνθήκες δοκιμής:

- ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια έκθεσης των κυττάρων,
- αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού των καλλιιεργειών συμπεριλαμβανομένων, π.χ. στοιχείων κυταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- σύσταση του μέσου καλλιέργειας και συγκέντρωση CO₂, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,
- όγκο του φορέα και της προστεθείσας υπό δοκιμή ουσίας,
- θερμοκρασία επώασης,
- χρόνο επώασης,
- διάρκεια της κατεργασίας,
- πυκνότητα των κυττάρων στην ανακαλλιέργεια, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- τύπο και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης συμπεριλαμβανομένων και κριτηρίων αποδοχής,
- θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες,
- μεθόδους προετοιμασίας των αντικειμενοφόρων,
- κριτήρια καταμέτρησης των εκτροπών,
- αριθμό των αναλυθεισών μεταφάσεων,
- μεθόδους για τις μετρήσεις τοξικότητας,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

- σημάδια τοξικότητας, π.χ. βαθμός συρροής, στοιχεία κυτταρικού κύκλου, αριθμός κυττάρων, μιτωτικός δείκτης,
- σημάδια καθίζησης
- στοιχεία για το pH και την οσμωμοριακότητα του μέσου κατεργασίας, εφόσον προσδιορίστηκαν,
- ορισμό των εκτροπών, συμπεριλαμβανομένων των χασμάτων,
- αριθμό κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές και τύπο χρωμοσωμικών εκτροπών ξεχωριστά για κάθε κατεργασθείσα καλλιέργεια και καλλιέργεια-μάρτυρα
- αλλαγές στην πλοειδία, εφόσον παρατηρήθηκαν,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,
- στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,
- παράλλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,
- ιστορικά στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
2. Ishidate, M.Jr. and 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., (Eds) 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., Rimpou, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), 1-175.
4. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
5. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and 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., Tates, 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 McCooley, 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. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ – *IN VIVO* ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ

ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *in vivo* δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών σε θηλαστικά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών που προκαλούνται από την υπό δοκιμή ουσία στα κύτταρα του μυελού των οστών ζώων, συνήθως τρωκτικών (1)(2)(3)(4). Οι δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Τυχόν αύξηση στην πολυπλοειδία μπορεί να σημαίνει ότι μία χημική ουσία έχει τη δυνατότητα να επάγει αριθμητικές εκτροπές. Τα περισσότερα χημικά μεταλλαξογόνα προκαλούν εκτροπές χρωματιδικού τύπου, απαντώνται όμως και εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου. Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα αποτελούν αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών του ανθρώπου και υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα που προκαλούν αλλοιώσεις σε ογκογονίδια και ογκογενή αποκαταστατικά γονίδια σωματικών κυττάρων συνδέονται με την εμφάνιση καρκίνου σε ανθρώπους και σε πειραματικά συστήματα.

Στην παρούσα δοκιμή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά. Στη δοκιμή αυτή, ιστός-στόχος είναι ο μυελός των οστών επειδή παρουσιάζει έντονη αγγείωση και περιλαμβάνει κύτταρα με ταχύ κυτταρικό κύκλο που μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να υποβληθούν σε κατεργασία. Τα υπόλοιπα είδη και ιστοί-στόχοι δεν εμπίπτουν στο θέμα της παρούσας μεθόδου.

Η παρούσα δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών έχει άμεση σχέση με την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξογένεσης δεδομένου ότι επιτρέπει την εξέταση παραγόντων *in vivo* μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και διεργασιών επιδιόρθωσης DNA αν και οι παράγοντες αυτοί μπορεί να διαφέρουν μεταξύ ειδών και μεταξύ ιστών. Η *in vivo* δοκιμή είναι επίσης χρήσιμη για περαιτέρω διερεύνηση τυχόν μεταλλαξογόνου δράσης που εντοπίζεται σε *in vitro* δοκιμή.

Εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία, ή οι μεταβολίτες της, δεν φθάνει στον ιστό-στόχο, δεν προσφέρεται η χρήση της παρούσας δοκιμής.

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή, Μέρος Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματιδίων ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματιδίων.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη, ή ρήξη και επανένωση, και των δύο χρωματιδίων στην ίδια θέση.

Ενδοαναδιπλασιασμός: διεργασία κατά την οποία έπειτα από μία S φάση αντιγραφής DNA, ο πυρήνας δεν υφίσταται μίτωση αλλά ξεκινά μία νέα S φάση. Το αποτέλεσμα είναι χρωμοσώματα με 4, 8, 16, ... χρωματίδες.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδας και με ελάχιστη απευθυγράμμιση της ή των χρωματιδών.

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιούμενων κυττάρων.

Πολυπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (n) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλ. 3n, 4n κ.ο.κ).

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που εντοπίζεται με παρατήρηση στο μικροσκόπιο του σταδίου της μεταφάσεως της διαίρεσης των κυττάρων και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ενδοανταλλαγών ή ανταλλαγών

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία από μία κατάλληλη οδό εκθέσεως και θυσιάζονται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή. Πριν από τη θυσία, τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή με ένα παράγοντα αναστολής μεταφάσεως (π.χ. κολχικίνη ή Colcemid®). Στη συνέχεια, από τα κύτταρα του μυελού των οστών, παρασκευάζονται χρωμοσωμικά παρασκευάσματα τα οποία χρωματίζονται και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται προς εντοπισμό τυχόν χρωμοσωμικών εκτροπών.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1 Προετοιμασίες

1.4.1.1 Επιλογή ζωικών ειδών

Συνήθως χρησιμοποιούνται επίμυες, ποντικοί και κινέζικοι κρικητοί, αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και οποιοδήποτε άλλο κατάλληλο είδος θηλαστικού. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους κάθε φύλου.

1.4.1.2 Συνθήκες στέγασης και διατροφής

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη Γενική Εισαγωγή του Μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60%.

1.4.1.3 Προετοιμασία των ζώων

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Κάθε ζώο παίρνει ξεχωριστή ταυτότητα. Τα ζώα εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες.

1.4.1.4 Προετοιμασία των δόσεων

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή αραιωμένες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα στοιχεία τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2 Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1 Διαλύτης/φορέας

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι από τους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας

1.4.2.2 Μάρτυρες

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες για κάθε φύλο. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες μαρτυρίας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή ομάδες.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν δομικές εκτροπές *in vivo* σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας και να δειγματίζονται μόνο μία φορά. Εφόσον υπάρχουν, μπορεί να εξετάζεται η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης. Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
Αιθυλο νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0	200-015-4
Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	6055-19-2	
Τριαθυλενομελαμίνη	51-18-3	200-083-5

Σε κάθε δειγματοληψία θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, υποβληθέντες σε αγωγή μόνο με διαλύτη ή φορέα αλλά με τον ίδιο κατά τα άλλα τρόπο με εκείνο των ομάδων της υπό δοκιμή ουσίας, εκτός κι αν από προϋπάρχοντα στοιχεία για τους μάρτυρες προκύπτουν αποδεκτές διαφοροποιήσεις και συχνότητες κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές. Εάν για τους αρνητικούς μάρτυρες γίνεται μία μόνο δειγματοληψία, ο καταλληλότερος χρόνος είναι ο χρόνος της πρώτης δειγματοληψίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης/φορέας δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξογόνα αποτελέσματα

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 Αριθμός και φύλο των ζώων

Κάθε υποβαλλόμενη σε αγωγή ομάδα και ομάδα-μάρτυρας πρέπει να περιλαμβάνει 5 τουλάχιστον προς εξέταση ζώα ανά φύλο. Εάν κατά το χρόνο της δοκιμής υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από μελέτες στο ίδιο είδος ζώου με τη ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ φύλων, αρκεί τότε η διεξαγωγή δοκιμής σε ένα μόνο φύλο. Στις περιπτώσεις όπου η έκθεση των ανθρώπων στις χημικές ουσίες εξαρτάται από το φύλο, όπως π.χ. μπορεί να συμβεί στην περίπτωση ορισμένων φαρμακευτικών παραγόντων, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται με ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2 Χρονοδιάγραμμα αγωγής

Οι υπό δοκιμή ουσίες χορηγούνται κατά προτίμηση με εφάπαξ αγωγή. Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορούν επίσης να χορηγηθούν και διακεκομμένα, δηλ. δύο αγωγές την ίδια ημέρα που να μην απέχουν χρονικά περισσότερο από μερικές ώρες, για να διευκολυνθεί η χορήγηση μεγάλης ποσότητας ουσίας. Άλλοι τυχόν χρησιμοποιούμενοι τρόποι αγωγής θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικώς.

Τα δείγματα θα πρέπει να λαμβάνονται σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά την αγωγή της μίας ημέρας. Για τα τροφικά, η πρώτη δειγματοληψία γίνεται σε χρόνο που αντιστοιχεί στο 1,5 της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου (ο τελευταίος είναι κανονικά 12-18 h) μετά την αγωγή. Επειδή ο απαιτούμενος χρόνος για την πρόσληψη και το μεταβολισμό της υπό δοκιμή ουσίας καθώς επίσης και η επίδρασή της στην κινητική του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επηρεάσει τον άριστο ενδεικνυόμενο χρόνο για την ανίχνευση χρωμοσωμικής εκτροπής, συνιστάται να γίνεται μία δεύτερη δειγματοληψία 24 ώρες μετά την πρώτη. Εφόσον η χορήγηση της ουσίας γίνεται σε χρονικό διάστημα που υπερβαίνει την μία ημέρα, η δειγματοληψία θα πρέπει να γίνεται έπειτα από χρονικό διάστημα που να αντιστοιχεί στο 1,5 της κανονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου μετρούμενο από την τελική αγωγή.

Πριν από τη θυσία, στα ζώα εγχύεται ενδοπεριτοναϊκώς κατάλληλη δόση παράγοντα αναστολής μετάφρασης (π.χ. Colcemid® ή κολχικίνη). Σε κατάλληλη μεταγενέστερη χρονική στιγμή πραγματοποιείται στα ζώα δειγματοληψία. Για τους ποντικούς, η καταλληλότερη στιγμή είναι περίπου 3-5 ώρες, ενώ για τους κινέζικους κρινητούς το διάστημα αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 4-5 ώρες. Συλλέγονται κότταρα από το μυελό των οστών και εξετάζονται από πλευράς χρωμοσωμικών εκτροπών.

1.5.3 **Επίπεδα δόσεων**

Εάν εκτελεστεί δοκιμή ανεύρεσης εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, αυτή θα πρέπει να εκτελείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο και τρόπο αγωγής που χρησιμοποιείται στην κύρια δοκιμή (5). Εφόσον υπάρχει τοξικότητα, για την πρώτη δειγματοληψία χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Τα επίπεδα αυτά δόσεων θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι τη χαμηλή ή μηδενική τοξικότητα. Για τη μεταγενέστερη δειγματοληψία, χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μόνο η μέγιστη δόση. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση τον ίδιο τρόπο χορήγησης, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ορισμένες ενδείξεις τοξικότητας στο μυελό των οστών (π.χ. μεγαλύτερη από 50% μείωση στο μιτωτικό δείκτη)

1.5.4 **Δοκιμή οριακής δόσης**

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Σε δοκιμές μεγαλύτερης διάρκειας, η οριακή δόση είναι 2000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μέχρι 14 ημέρες και 1000 mg/kg βάρους σώματος/day για αγωγή μεγαλύτερη από 14 ημέρες. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5 **Χορήγηση των δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης ή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσεων.

1.5.6 **Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων**

Αμέσως μετά τη θυσία λαμβάνεται μυελός των οστών, εκτίθεται σε υπότονο διάλυμα και στερεώνεται. Τα κύτταρα κατόπιν απλώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίζονται.

1.5.7 Ανάλυση

Θα πρέπει να προσδιορίζεται ο μιτωτικός δείκτης ως μέτρο της κυτταροτοξικότητας σε 1000 τουλάχιστον κύτταρα ανά ζώο για όλα τα υποβληθέντα σε αγωγή ζώα (συμπεριλαμβανομένων και των θετικών μαρτύρων) και τα μη υποβληθέντα σε αγωγή ζώα-αρνητικούς μάρτυρες.

Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 100 κύτταρα. Ο αριθμός αυτός μπορεί να μειωθεί όταν παρατηρείται υψηλός αριθμός εκτροπών. Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να λαμβάνουν έναν ανεξάρτητο κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Επειδή οι διαδικασίες προετοιμασίας των αντικειμενοφόρων απολήγουν συχνά στη ρήξη ενός ποσοστού μεταφάσεων με απώλεια χρωμοσωμάτων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει συνεπώς να περιέχουν έναν αριθμό κεντρομεριδίων ίσο με τον αριθμό $2n \pm 2$.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα επιμέρους στοιχεία για τα ζώα. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εκτιμάται ο αριθμός των καταμετρηθέντων κυττάρων, ο αριθμός των εκτροπών ανά κύτταρο και το ποσοστό των κυττάρων με δομική ή δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών θα πρέπει να καταγράφονται με τον αριθμό και τη συχνότητά τους στις υποβληθείσες σε αγωγή και τις ομάδες-μάρτυρες. Τα χάσματα καταγράφονται ξεχωριστά και περιλαμβάνονται στην έκθεση, γενικά όμως δεν περιλαμβάνονται στη συνολική συχνότητα εκτροπών. Εφόσον δεν υπάρχουν ενδείξεις διαφοράς αποκρίσεως ανάλογα με το φύλο, τα δεδομένα από τα δύο φύλα μπορούν να συνδυάζονται για στατιστική ανάλυση

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό υπάρχουν διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση στο σχετικό αριθμό κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές ή η σαφής αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με εκτροπές σε ομάδα μίας μόνης δόσης σε μία μόνη δειγματοληψία. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (6). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα. Τυχόν διαφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να διασαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές, τροποποιώντας, κατά προτίμηση, τις πειραματικές συνθήκες.

Τυχόν αύξηση στην πολυπλοειδία μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να επάγει αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Τυχόν αύξηση στον ενδοαναδιπλασιασμό μπορεί να σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να παρεμποδίζει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου (7)(8).

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαζογόνος στη δοκιμή αυτή.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστηριότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διαφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vivo* δοκιμή χρωμοσωμικών εκτροπών δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές στο μυελό των οστών των εξετασθέντων ειδών. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές στο μυελό των οστών των εξετασθέντων ειδών.

Θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα πρόσβασης της υπό δοκιμή ουσίας ή των μεταβολιτών της στη γενική κυκλοφορία ή ειδικότερα στον ιστό στόχο (π.χ. συστημακή τοξικότητα).

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/Φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέας, εφόσον είναι γνωστές,

Εξετασθέντα ζώα:

- χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,
- αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,
- πηγή, συνθήκες στέγασης, διαίτα, κλπ,
- βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρους των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα

Συνθήκες δοκιμής:

- θετικούς και αρνητικούς (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες,
- στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,
- αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δόσεως,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης,
- μεθόδους επαλήθευσης του ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον ιστό στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη διαίτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον χρειάζεται,
- στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού
- λεπτομερή περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,
- μεθόδους για τις μετρήσεις της τοξικότητας,
- ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφρασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,
- μεθόδους προετοιμασίας αντικειμενοφόρων,
- κριτήρια καταμέτρησης των εκτροπών,
- αριθμό εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διαφορούμενης.

Αποτελέσματα:

- σημάδια τοξικότητας,
- μιτωτικό δείκτη,
- τύπο και αριθμό εκτροπών ξεχωριστά για κάθε ζώο,
- ολικό αριθμό εκτροπών ανά ομάδα με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,
- αριθμό κυττάρων με εκτροπές ανά ομάδα με μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις
- αλλαγές στην πλοειδία, εφόσον παρατηρήθηκαν,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,
- στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,
- τα παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες,
- ιστορικά στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.
- τα παράλληλα στοιχεία για τους θετικούς μάρτυρες

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. REFERENCES

1. Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
2. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and 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. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) 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, pp. 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. and 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. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.
6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 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. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin - induced endoreduplication in Chinese hamster cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

B. 12. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ - *IN VIVO* ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ

ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *in vivo* δοκιμή μικροπυρήνων σε θηλαστικά χρησιμοποιείται για την ανίχνευση βλάβης προκαλούμενης από την υπό δοκιμή ουσία στα χρωμοσώματα ή τη μιτωτική συσκευή ερυθροβλαστών με εξέταση ερυθροκυττάρων λαμβανομένων από το μυελό των οστών και/ή περιφερικά αιμοκύτταρα ζώων, συνήθως τρωκτικών.

Σκοπός της δοκιμής μικροπυρήνων είναι η αναγνώριση ουσιών που προκαλούν κυτταρογενετική βλάβη που απολήγει στο σχηματισμό μικροπυρήνων που περιέχουν λανθάνοντα χρωμοσωμικά θραύσματα ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Όταν ένας ερυθροβλάστης μυελού των οστών αναπτυχθεί σε πολυχρωμικό ερυθροκύτταρο, ο κύριος πυρήνας εκβάλλεται και οι μικροπυρήνες που έχουν σχηματιστεί μπορεί να παραμείνουν πίσω στο άλλως απύρηνο κυτταρόπλασμα. Η παρατήρηση των μικροπυρήνων διευκολύνεται στα κύτταρα αυτά επειδή δεν έχουν κύριο πυρήνα. Τυχόν αύξηση στη συχνότητα των περιεχόντων μικροπυρήνες πολυχρωμικών ερυθροκυττάρων στα ζώα που έχουν υποβληθεί σε αγωγή αποτελεί ένδειξη προκληθείσας χρωμοσωμικής βλάβης.

Στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιείται συνήθως μυελός των οστών τρωκτικών επειδή στον ιστό αυτό παράγονται πολυχρωμικά ερυθροκύτταρα. Εξ ίσου αποδεκτή είναι και η μέτρηση φερόντων μικροπυρήνες άωρων (πολυχρωμικών) ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα σε οποιοδήποτε είδος στο οποίο έχει καταδειχθεί ότι ο σπλήνας δεν μπορεί να απομακρύνει ερυθροκύτταρα που φέρουν μικροπυρήνες ή το οποίο εμφανίζει κακή ευαισθησία στην ανίχνευση παραγόντων που προκαλούν δομικές ή αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Οι μικροπυρήνες μπορούν να διακριθούν με βάση ορισμένα κριτήρια. Στα κριτήρια αυτά περιλαμβάνεται ο εντοπισμός της παρουσίας ή απουσίας DNA κινητοχώρου ή κεντρομεριδίου στους μικροπυρήνες. Βασικό τελικό σημείο είναι η εύρεση της συχνότητας των φερόντων μικροπυρήνες άωρων (πολυχρωμικών) ερυθροκυττάρων. Ως βασικό τελικό σημείο της δοκιμής μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η εύρεση του αριθμού των ώριμων (ορθοχρωμικών) ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα που περιέχουν μικροπυρήνες μεταξύ ενός δεδομένου αριθμού ώριμων ερυθροκυττάρων όταν τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή συνεχώς επί 4 εβδομάδες ή και περισσότερο.

Αυτή η *in vivo* δοκιμή μικροπυρήνων στα θηλαστικά έχει άμεση σχέση με την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξογένεσης δεδομένου ότι επιτρέπει την εξέταση παραγόντων του *in vivo* μεταβολισμού, φαρμακοκινητικής και διεργασιών επιδιόρθωσης DNA αν και αυτοί μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το είδος, ανάλογα με τον ιστό και ανάλογα με τα γενετικά τελικά σημεία. Οι *in vivo* δοκιμές είναι επίσης χρήσιμες για την περαιτέρω διερεύνηση της μεταλλαξογόνου δράσης που ανιχνεύεται από ένα *in vitro* σύστημα.

Εάν υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία, ή μεταβολίτης της, δεν θα φθάσει στον ιστό στόχο, δεν προσφέρεται η χρήση της παρούσας δοκιμής.

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρος Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Κεντρομερίδιο (Κινητοχώρος): Περιοχή ή περιοχές ενός χρωμοσώματος με τις οποίες τα ινίδια της απράκτου ενώνονται κατά τη διάρκεια της διαίρεσης του κυττάρου δίνοντας τη δυνατότητα μεθοδευμένης κίνησης των θυγατρικών χρωμοσωμάτων προς τους πόλους των θυγατρικών κυττάρων.

Μικροπυρήνες: Μικροί πυρήνες, διάκριτοι και επιπλέον των κύριων πυρήνων των κυττάρων, που παράγονται κατά τη διάρκεια της τελόφασης της μίτωσης (μείωση) από λανθάνοντα χρωμοσωμικά θραύσματα ή ολόκληρα χρωμοσώματα.

Ορθοχρωμικό ερυθροκύτταρο: Ώριμο ερυθροκύτταρο χωρίς ριβοσώματα που διακρίνεται από τα άωρα, πολυχρωμικά ερυθροκύτταρα μέσω επιλεκτικών για τα ριβοσώματα χρώσεων.

Πολυχρωμικό ερυθροκύτταρο: Άωρο ερυθροκύτταρο, σε ενδιάμεσο στάδιο ανάπτυξης, που περιέχει ακόμη ριβοσώματα και συνεπώς μπορεί να διακριθεί από τα ώριμα, ορθοχρωμικά ερυθροκύτταρα με χρώσεις ειδικές για τα ριβοσώματα.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία μέσω κατάλληλης οδού χορήγησης. Εφόσον χρησιμοποιείται μυελός των οστών, τα ζώα θυσιάζονται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή, εξάγεται ο μυελός των οστών και στη συνέχεια τα λαμβανόμενα παρασκευάσματα χρωματίζονται (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Όταν χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, το αίμα συλλέγεται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή και τα λαμβανόμενα παρασκευάσματα επιστροφής χρωματίζονται (4)(8)(9)(10). Στις δοκιμές με περιφερικό αίμα θα πρέπει να μεσολαβεί όσο το δυνατό λιγότερος χρόνος μεταξύ της τελευταίας έκθεσης και της συλλογής των κυττάρων. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται για να διαπιστωθεί η παρουσία ή μη μικροπυρήνων.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1 Προετοιμασίες

1.4.1.1 Επιλογή ζωικών ειδών

Εφόσον για τη δοκιμή χρησιμοποιείται μυελός των οστών, συνιστάται η χρήση ποντικών ή επίμων αν και μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο είδος θηλαστικού. Όταν χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, συνιστάται η χρήση ποντικών. Εντούτοις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε κατάλληλο είδος θηλαστικού υπό την προϋπόθεση ότι είναι είδος στο οποίο ο σπλήνας δεν απομακρύνει τα φέροντα μικροπυρήνες ερυθροκύτταρα ή είδος που εμφανίζει ικανή ευαισθησία στην ανίχνευση παραγόντων που προκαλούν δομικές ή αριθμητικές χρωμοσωμικές εκτροπές. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, η διαφοροποίηση στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους κάθε φύλου.

1.4.1.2 Συνθήκες στέγασης και διατροφής

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη Γενική Εισαγωγή του Μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60%.

1.4.1.3 Προετοιμασία των ζώων

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες-μάρτυρες και αγωγής. Σε κάθε ζώο δίνεται μία ξεχωριστή ταυτότητα. Τα ζώα εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών..

1.4.1.4 Προετοιμασία των δόσεων

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή αραιωμένες πριν από τη χορήγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν στοιχεία που υπάρχουν σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2 Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1 Διαλύτης/φορέας

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι από τους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα αν μπορεί να χρησιμοποιηθεί υδατικός διαλύτης/φορέας.

1.4.2.2 Μάρτυρες

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες για κάθε φύλο. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες-μάρτυρες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων που ανήκουν στις ομάδες αγωγής.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να παράγουν μικροτυρήνες *in vivo* σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας και να δειγματίζονται μόνο μία φορά. Εφόσον υπάρχουν, μπορεί να εξετασθεί η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης. Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
N-Αιθυλο-N- νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0	200-015-4
Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	6055-19-2	
Τριαθυλενομελαμίνη	51-18-3	200-083-5

Για κάθε δειγματοληψία θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, μόνο με διαλύτη ή φορέα, αλλά υποβληθέντες στην ίδια κατά τα άλλα αγωγή με εκείνη των ομάδων της υπό δοκιμή ουσίας, εκτός κι αν από προϋπάρχοντα στοιχεία για τους μάρτυρες προκύπτουν αποδεκτές διαφοροποιήσεις και συχνότητες κυττάρων με μικροπυρήνες μεταξύ των ζώων. Εάν για τους αρνητικούς μάρτυρες γίνεται μία μόνο δειγματοληψία, ο καταλληλότερος χρόνος είναι ο χρόνος της πρώτης δειγματοληψίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης/φορέας δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξογόνα αποτελέσματα

Εφόσον χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα, μπορεί επίσης να γίνει αποδεκτό ως παράλληλος αρνητικός μάρτυρας και ένα δείγμα προ-αγωγής, αλλά μόνο στις βραχυχρόνιες δοκιμές με περιφερικό αίμα (π.χ., 1-3 αγωγές) όταν τα προκύπτοντα στοιχεία ευρίσκονται στην αναμενόμενη βάση ιστορικού περιοχής για το μάρτυρα.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 Αριθμός και φύλο των ζώων

Κάθε υποβαλλόμενη σε αγωγή ομάδα και ομάδα-μάρτυρας πρέπει να περιλαμβάνει 5 τουλάχιστον ζώα ανά φύλο (11). Εάν κατά το χρόνο της δοκιμής υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα από μελέτες στο ίδιο είδος ζώου με την ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ φύλων, αρκεί τότε η διεξαγωγή δοκιμής σε ένα μόνο φύλο. Στις περιπτώσεις όπου η έκθεση των ανθρώπων στις χημικές ουσίες εξαρτάται από το φύλο, όπως π.χ. μπορεί να συμβεί στην περίπτωση ορισμένων φαρμακευτικών παραγόντων, η δοκιμή θα πρέπει να εκτελείται σε ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2 Χρονοδιάγραμμα αγωγής

Δεν μπορεί να προταθεί κανένα τυποποιημένο χρονοδιάγραμμα αγωγής (δηλ. 1, 2 ή περισσότερες αγωγές σε διαστήματα 24 h). Τα δείγματα από παρατεταμένες δοσολογικές αγωγές είναι αποδεκτά εφόσον υπάρχει αποδεδειγμένο θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή αυτή ή, στην περίπτωση αρνητικής δοκιμής, εφόσον έχει αποδειχθεί η ύπαρξη τοξικότητας ή έχει χρησιμοποιηθεί η οριακή δόση και η χορήγηση συνεχίστηκε μέχρι τη στιγμή της δειγματοληψίας. Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορούν επίσης να χορηγηθούν και σε διακεκομμένη δόσολογία, δηλ. δύο αγωγές την ίδια ημέρα που να μην απέχουν χρονικά περισσότερο από λίγες ώρες, για να διευκολυνθεί η χορήγηση μεγάλης ποσότητας ουσίας.

Η δοκιμή μπορεί να εκτελεστεί με δύο τρόπους:

(α) Τα ζώα υποβάλλονται σε εφάπαξ αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία. Στην περίπτωση του μυελού των οστών λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον δύο φορές, ξεκινώντας το νωρίτερο 24 ώρες μετά την αγωγή, αλλά μην υπερβαίνοντας τις 48 ώρες από την αγωγή με κατάλληλα διαστήματα μεταξύ των δειγμάτων. Τυχόν λήψη δείγματος πριν από την παρέλευση 24 ωρών μετά την αγωγή θα πρέπει να αιτιολογείται. Στην περίπτωση του περιφερικού αίματος λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον δύο φορές, ξεκινώντας το νωρίτερο 36 ώρες μετά την αγωγή και αφήνοντας να περάσει κατάλληλο χρονικό διάστημα από την πρώτη δειγματοληψία για τη λήψη των επομένων αλλά όχι αργότερα από τις 72 ώρες. Εφόσον σε μία δειγματοληψία εντοπιστεί θετική απόκριση, δεν απαιτείται η λήψη άλλου δείγματος.

(β) Εφόσον γίνουν 2 ή περισσότερες ημερήσιες αγωγές (π.χ. δύο ή περισσότερες αγωγές σε διάστημα 24 ωρών), θα πρέπει να γίνει μία μόνο δειγματοληψία στο χρονικό διάστημα μεταξύ 18 και 24 ωρών μετά την τελική αγωγή για το μυελό των οστών και μία πάλι δειγματοληψία στο χρονικό διάστημα μεταξύ 36 και 48 ωρών από την τελική αγωγή για το περιφερικό αίμα (12)

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιπροσθέτως και άλλοι χρόνοι δειγματοληψίας, όταν χρειάζεται.

1.5.3 **Επίπεδα δόσεων**

Εάν εκτελεστεί δοκιμή ανεύρεσης εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, αυτή θα πρέπει να εκτελείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο και τρόπο αγωγής που χρησιμοποιείται στην κύρια δοκιμή (13). Εφόσον υπάρχει τοξικότητα, για την πρώτη δειγματοληψία χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Τα επίπεδα αυτά δόσεων θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι χαμηλή ή μηδενική τοξικότητα. Στη μεταγενέστερη δειγματοληψία, χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί μόνο η μέγιστη δόση. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση το ίδιο δοσολογικό καθεστώς, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στο μυελό των οστών (π.χ. μείωση στο ποσοστό άρων ερυθροκυττάρων μεταξύ πλήρων ερυθροκυττάρων στο μυελό των οστών ή το περιφερικό αίμα).

1.5.4 **Δοκιμή οριακής δόσης**

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία εφαρμόζεται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Σε μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας, η οριακή δόση είναι 2000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μέχρι 14 ημέρες και 1000 mg/kg βάρους σώματος/day για αγωγή μεγαλύτερη από 14 ημέρες. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5 **Χορήγηση δόσεων**

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης ή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή με έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα με υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

1.5.6 **Προετοιμασία του μυελού/αίματος**

Τα κύτταρα του μυελού των οστών λαμβάνονται συνήθως από τα μηριαία οστά ή τα οστά των κνημών αμέσως μετά τη θυσία. Συνήθως, τα κύτταρα απομακρύνονται από τα εν λόγω οστά, μορφώνονται σε παρασκευάσματα και χρωματίζονται χρησιμοποιώντας καθιερωμένες μεθόδους. Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται από την ουραία φλέβα ή άλλο κατάλληλο αιμοφόρο αγγείο. Τα αιμοκύτταρα χρωματίζονται αμέσως υπερζωϊκώς (8)(9)(10) ή λαμβάνονται επιστρωμένα παρασκευάσματα και κατόπιν χρωματίζονται. Χρησιμοποιώντας μία ειδική για το DNA χρωστική [π.χ. πορτοκαλόχρουν ακριδίνης (14) ή Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)] μπορούν να εξαιρεθούν ορισμένα από τα τεχνικά σφάλματα που προκαλούνται από τη χρήση μη ειδικής για το DNA χρωστικής. Το πλεονέκτημα αυτό δεν αποκλείει τη χρήση συμβατικών χρωστικών (π.χ. Giemsa). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και πρόσθετα συστήματα [π.χ. στήλες κυτταρίνης για την απομάκρυνση εμπύρηνων κυττάρων (16)] υπό την προϋπόθεση ότι τα συστήματα αυτά έχουν αποδειχθεί κατάλληλα για την παρασκευή μικροπυρήνων στο εργαστήριο.

1.5.7 Ανάλυση

Η αναλογία των άωρων στο σύνολο (άωρα + ώριμα) των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται για κάθε ζώο μετρώντας ένα σύνολο τουλάχιστον 200 ερυθροκυττάρων για το μυελό των οστών και 1000 ερυθροκυττάρων για το περιφερικό αίμα (17). Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να λαμβάνουν ένα διαφορετικό κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Για τον προσδιορισμό της συχνότητας εμφάνισης άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνα καταμετρώνται τουλάχιστον 2000 άωρα ερυθροκύτταρα ανά ζώο. Μπορούν να ληφθούν και άλλες πληροφορίες καταμετρώντας ώριμα ερυθροκύτταρα για μικροπυρήνες. Κατά την εξέταση των αντικειμενοφόρων, η αναλογία των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 20% της τιμής του μάρτυρα. Όταν τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή συνεχώς για 4 ή και περισσότερες εβδομάδες, για τη συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων μπορούν να καταμετρηθούν επίσης τουλάχιστον 2000 ώριμα ερυθροκύτταρα ανά ζώο. Ως εναλλακτικός τρόπος εκτίμησης αντί εκείνου με τα χέρια, μπορούν να γίνουν δεκτά και συστήματα αυτόματης ανάλυσης (ανάλυση εικόνας και κυτταρομετρία ροής κυτταρικών εναιωρημάτων), εφόσον υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση και επικύρωση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα επιμέρους στοιχεία για κάθε ζώο. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Για κάθε εξεταζόμενο ζώο θα πρέπει να καταγράφεται χωριστά ο αριθμός των καταμετρηθέντων άωρων ερυθροκυττάρων, ο αριθμός των φερόντων μικροπυρήνες άωρων ερυθροκυττάρων και ο αριθμός των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων. Όταν τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή συνεχώς για 4 ή περισσότερες εβδομάδες, θα πρέπει επίσης να δίνονται και τα στοιχεία για τα ώριμα ερυθροκύτταρα, εφόσον ελήφθησαν. Για κάθε ζώο δίνεται η αναλογία των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων και, εφόσον συντρέχει περίπτωση, το ποσοστό των φερόντων μικροπυρήνες ερυθροκυττάρων. Εφόσον δεν υπάρχουν ενδείξεις διαφοράς αποκρίσεως ανάλογα με το φύλο, τα δεδομένα από τα δύο φύλα μπορούν να συνδυάζονται για στατιστική ανάλυση.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ως θετικό ένα αποτέλεσμα υπάρχουν διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με μικροπυρήνες ή η σαφής αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με μικροπυρήνες σε ομάδα μίας μόνης δόσης σε μία μόνη δειγματοληψία. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (18)(19). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα. Τυχόν διφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να διασαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές και τροποποιώντας, κατά προτίμηση, τις πειραματικές συνθήκες.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξογόνος στη δοκιμή αυτή.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστηριότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα στη δοκιμή μικροπυρήνων δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία προκαλεί την παραγωγή μικροπυρήνων που είναι αποτέλεσμα χρωμοσωμικής βλάβης ή βλάβης στη μιτωτική συσκευή στους ερυθροβλάστες του εξετασθέντος είδους. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν παράγει μικροπυρήνες στα άωρα ερυθροκύτταρα του εξετασθέντος είδους.

Θα πρέπει να εξετάζεται αν η υπό δοκιμή ουσία ή οι μεταβολίτες της έχουν τη δυνατότητα πρόσβασης στη γενική κυκλοφορία ή ειδικότερα στον ιστό στόχο (π.χ. συστηματική τοξικότητα).

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/Φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέας, εφόσον είναι γνωστές,

Εξετασθέντα ζώα:

- χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,
- αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,
- πηγή, συνθήκες στέγασης, διαίτα, κλπ,
- βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρους των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα

Συνθήκες δοκιμής:

- θετικούς και αρνητικούς (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες,
- στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,
- αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δόσεως,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης,
- μεθόδους επαλήθευσης του ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον ιστό στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη διαίτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον χρειάζεται,
- στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού
- λεπτομερή περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας
- μεθόδους ετοιμασίας αντικειμενοφόρων
- μεθόδους για τις μετρήσεις της τοξικότητας,
- κριτήρια για την καταμέτρηση των φερόντων μικροπυρήνες άωρων ερυθροκυττάρων,
- αριθμό εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διαφορούμενης.

Αποτελέσματα:

- σημάδια τοξικότητας,
- αναλογία άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων,
- αριθμό φερόντων μικροκυρήνες άωρων ερυθροκυττάρων, χωριστά για κάθε ζώο,
- μέση τιμή ± τυπική απόκλιση των φερόντων μικροκυρήνες ερυθροκυττάρων ανά ομάδα,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,
- στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι,
- παράλληλα και προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες,
- παράλληλα στοιχεία για τους θετικούς μάρτυρες

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. and 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. and 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., and 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", Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and 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., and 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., and 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. and 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. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, 293-304.
12. Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 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. and 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. and 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. and 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. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, 91-104.
17. Gollapudi, B. and 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. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) 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, pp. 115-141.
19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 13/14. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ : ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ

ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιούνται απαιτούντα αμινοξέα στελέχη *Salmonella typhimurium* και *Escherichia coli* για τον εντοπισμό σημειακών μεταλλάξεων, που περιλαμβάνουν υποκατάσταση, προσθήκη ή απώλειση ενός ή μερικών ζευγών βάσεων DNA (1)(2)(3). Η αρχή της δοκιμής αυτής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης συνίσταται στο ότι ανιχνεύει μεταλλάξεις που αναστρέφουν μεταλλάξεις που υπάρχουν στα υπό δοκιμή στελέχη και αποκαθιστούν τη λειτουργική ικανότητα των βακτηρίων για σύνθεση ενός βασικού αμινοξέος. Τα αναστραφέντα βακτήρια ανιχνεύονται από την ικανότητά τους να αναπτύσσονται απουσία του αμινοξέος που απαιτείται από το γονικό υπό δοκιμή στέλεχος.

Οι σημειακές μεταλλάξεις είναι το αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών στους ανθρώπους και υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι οι σημειακές μεταλλάξεις στα ογκογονίδια και στα ογκογενή αποκαταστατικά γονίδια σωματικών κυττάρων εμπλέκονται στη δημιουργία όγκων στους ανθρώπους και σε πειραματόζωα. Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης είναι ταχεία, φθηνή σχετικώς εύκολη να γίνει. Πολλά από τα υπό δοκιμή στελέχη παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πιο ευαίσθητα για την ανίχνευση μεταλλάξεων και στα οποία περιλαμβάνονται αποκρινόμενες ακολουθίες DNA στις θέσεις αναστροφής, αυξημένη κυτταρική διαπερατότητα στα μεγάλα μόρια και εξάλειψη των συστημάτων επιδιόρθωσης DNA ή ενίσχυση των επιρρεπών σε σφάλματα διεργασιών επιδιόρθωσης DNA. Η εξειδίκευση των υπό δοκιμή στελεχών μπορεί να παράσχει ορισμένες χρήσιμες πληροφορίες για τους τύπους μεταλλάξεων που προκαλούνται από γονοτοξικούς παράγοντες. Για τις δοκιμές βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης υπάρχει διαθέσιμη μία πολύ μεγάλη βάση δεδομένων με αποτελέσματα για μία μεγάλη ποικιλία δομών ενώ έχουν αναπτυχθεί αρκετές καθιερωμένες πλέον μεθοδολογίες για τον έλεγχο χημικών ουσιών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων και πτητικών ενώσεων.

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρους Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Η δοκιμή ανάστροφης μετάλλαξης στη *Salmonella typhimurium* ή στα *Escherichia coli* ανιχνεύει μετάλλαξη σε απαιτούν αμινοξύ στέλεχος (ιστιδίνη ή θρυπτοφάνη, αντίστοιχα) για την παραγωγή στελεχούς που δεν εξαρτάται από την έξωθεν παροχή αμινοξέος.

Μεταλλαξογόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων είναι παράγοντες που προκαλούν αλλαγή βάσεων στο DNA. Στη δοκιμή αναστροφής η αλλαγή αυτή μπορεί να συμβεί στη θέση της αρχικής μετάλλαξης ή σε μία άλλη θέση του βακτηριακού γονιδιώματος.

Μεταλλαξογόνα αλλαγής πλαισίου είναι παράγοντες που προκαλούν την προσθήκη ή απώλειση ενός ή περισσότερων ζευγών βάσεων στο DNA, μεταβάλλοντας έτσι το αναγνωστικό πλαίσιο στο RNA.

Στη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιούνται προκαρυωτικά κύτταρα τα οποία διαφέρουν από τα κύτταρα των θηλαστικών σε ορισμένα σημεία όπως η πρόσληψη, ο μεταβολισμός, η χρωμοσωμική δομή και οι διεργασίες επιδιόρθωσης DNA. Οι δοκιμές που πραγματοποιούνται *in vitro* απαιτούν εν γένει τη χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Τα *in vitro* συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μπορούν να μιμηθούν πλήρως τις *in vivo* συνθήκες στα θηλαστικά. Συνεπώς, η δοκιμή δεν παρέχει άμεσες πληροφορίες για τη μεταλλαξογόνο και καρκινογόνο δυνατότητα μιας ουσίας στα θηλαστικά.

Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης χρησιμοποιείται συνήθως ως μία αρχική δοκιμή προσανατολισμού για τη γονοτοξική δραστηριότητα και, ιδιαίτερα, την επάγουσα σημειακές μεταλλάξεις. Από πολυάριθμα συλλεγμένα στοιχεία καταδεικνύεται ότι πολλά χημικά που είναι θετικά στη δοκιμή αυτή εμφανίζουν μεταλλαξογόνο δράση και σε άλλες δοκιμές. Υπάρχουν παραδείγματα μεταλλαξογόνων παραγόντων που δεν ανιχνεύονται στη δοκιμή αυτή. Οι ατέλειες αυτές μπορούν να αποδοθούν στην ειδική φύση του ανιχνευόμενου τελικού σημείου, στις διαφορές στη μεταβολική ενεργοποίηση ή στις διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα. Από την άλλη μεριά, παράγοντες που ενισχύουν την ευαισθησία της δοκιμής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης μπορούν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της μεταλλαξογόνου δραστηριότητας.

Η δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης μπορεί να μη προσφέρεται για την αξιολόγηση ορισμένων τάξεων χημικών ουσιών όπως, π.χ., για ισχυρά βακτηριοκτόνες ενώσεις (π.χ. ορισμένα αντιβιοτικά) και ενώσεις που θεωρείται (ή είναι γνωστό) ότι παρεμβαίνουν ειδικά στο σύστημα κυτταρικής αντιγραφής των θηλαστικών (π.χ. ορισμένοι αναστολείς της τοποϊσομεράσης και ορισμένα νουκλεοσιδικά ανάλογα). Για τις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να προσφέρονται περισσότερο οι δοκιμές μετάλλαξης στα θηλαστικά.

Αν και πολλές ενώσεις που είναι θετικές στη δοκιμή αυτή είναι καρκινογόνες στα θηλαστικά, ο συσχετισμός αυτός δεν είναι απόλυτος. Εξαρτάται από την τάξη της χημικής ένωσης και υπάρχουν καρκινογόνα που δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμή αυτή επειδή δρουν μέσω άλλων, μη γονοτοξικών, μηχανισμών ή μηχανισμών που δεν υφίστανται στα βακτηριακά κύτταρα.

Εναιωρήματα βακτηριακών κυττάρων εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία εξωγενούς συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Στη μέθοδο προσθήκης σε τρυβλίο, τα εναιωρήματα αυτά αναμειγνύονται με άγαρ επικάλυψης και επιστρώνονται αμέσως σε ελάχιστη ποσότητα θρεπτικού μέσου. Στη μέθοδο προεπώσεως, το μίγμα κατεργασίας επωάζεται και κατόπιν αναμειγνύεται με άγαρ επιστρώσεως πριν επιστρωθεί σε ελάχιστη ποσότητα μέσου. Και στις δύο τεχνικές, έπειτα από δύο ή τρεις ημέρες επώσεως, μετρώνται οι ανάστροφες αποικίες και ο αριθμός τους συγκρίνεται με τον αριθμό των αυθόρμητων ανάστροφων αποικιών σε τρυβλία-μάρτυρες με διαλύτη.

Έχουν περιγραφεί διάφορες διαδικασίες για την εκτέλεση της δοκιμής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης. Μεταξύ εκείνων που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η μέθοδος προσθήκης σε τρυβλίο (1)(2)(3)(4), η μέθοδος προεπώσεως (2)(3)(5)(6)(7)(8), η μέθοδος διακύμανσης (9)(10) και η μέθοδος εναιωρήματος (11). Έχουν περιγραφεί επίσης και τροποποιήσεις για τη δοκιμασία αερίων ή ατμών (12).

Οι διαδικασίες που περιγράφονται στη μέθοδο σχετίζονται κυρίως με τις μεθόδους προσθήκης σε τρυβλίο και προεπιώσεως. Και οι δύο είναι αποδεκτές για την πραγματοποίηση πειραμάτων και με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Ορισμένες ουσίες μπορούν να ανιχνευθούν αποτελεσματικότερα με τη μέθοδο προεπιώσεως. Οι ουσίες αυτές ανήκουν σε μία σειρά χημικών τάξεων στην οποία περιλαμβάνονται οι αλειφατικές νιτροζαμίνες με βραχεία αλυσίδα, τα δισθενή μέταλλα, αλδεύδες, αζωχρώματα και διαζωενώσεις, πυρολλιζιδινικά αλκαλοειδή, αλλυλοενώσεις και νιτροενώσεις (3). Αναγνωρίζεται επίσης ότι ορισμένες τάξεις μεταλλαζογόνων δεν ανιχνεύονται πάντοτε με τις τυποποιημένες διαδικασίες όπως με τη μέθοδο προσθήκης σε τρυβλίο ή με τη μέθοδο προεπιώσεως. Αυτές θα πρέπει να θεωρούνται ως "ειδικές περιπτώσεις" και συνιστάται ιδιαίτερα να χρησιμοποιούνται για την ανίχνυσή τους εναλλακτικές διαδικασίες. Ως "ειδικές περιπτώσεις" μπορούν να αναφερθούν οι ακόλουθες (μαζί με παραδείγματα διαδικασιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνυσή τους): αζωχρώματα και διαζωενώσεις (3)(5)(6)(13), αέρια και πτητικές ουσίες (12)(14)(15)(16) και γλυκοζίτες (17)(18). Τυχόν παρέκλιση από την τυποποιημένη διαδικασία πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικά.

1.5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1 Προετοιμασίες

1.5.1.1 Βακτήρια

Πρόσφατες καλλιέργειες βακτηρίων θα πρέπει να αφήνονται να αναπτυχθούν μέχρι το τελευταίο στάδιο της εκθετικής ή το πρώτο στάδιο της στατικής φάσης αναπτύξεως (περίπου 10^9 κύτταρα ανά ml). Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καλλιέργειες που βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο της στατικής φάσης. Παίζει σημαντικό ρόλο οι χρησιμοποιούμενες καλλιέργειες να εμφανίζουν υψηλό τίτλο βιώσιμων βακτηρίων. Ο τίτλος μπορεί να βρεθεί είτε από προϋπάρχοντα στοιχεία για τις καμπύλες αύξησης, είτε σε κάθε δοκιμή με τον προσδιορισμό του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων με δοκιμή σε τρυβλίο.

Η συνιστώμενη θερμοκρασία επώσεως είναι 37°C.

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πέντε τουλάχιστον στελέχη βακτηρίων. Σε αυτά θα πρέπει να περιλαμβάνονται τέσσερα στελέχη *S. typhimurium* (TA 1535, TA 1537 ή TA97a ή TA97, TA98 και TA100) που έχει αποδειχθεί ότι είναι αξιόπιστα και παρέχουν αναπαραγώγιμες αποκρίσεις μεταξύ εργαστηρίων. Τα τέσσερα αυτά στελέχη *S. typhimurium* έχουν GC ζεύγη βάσεων στην πρωταρχική θέση αναστροφής και είναι γνωστό ότι δεν μπορούν να εντοπίσουν ορισμένα οξειδωτικά μεταλλαζογόνα., παράγοντες σταυροειδούς σύνδεσης και υδραζίνες. Οι ουσίες αυτές μπορούν να ανιχνευθούν με στελέχη *E. coli* WP2 ή *S. typhimurium* TA102 (19) που έχουν ένα ζεύγος βάσεων AT στην πρωταρχική θέση αναστροφής. Συνεπώς, ο συνιστώμενος συνδυασμός στελεχών είναι:

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

Για να ανιχνευθούν μεταλλαζογόνα σταυροειδούς σύνδεσης μπορεί να είναι σκόπιμο να περιληφθεί TA102 ή να προστεθεί ένα ειδικό για την επιδιόρθωση DNA στέλεχος *E. coli* [π.χ. *E. coli* WP2 ή *E. coli* WP2 (pKM101)].

Για την παρασκευή έτοιμων καλλιιεργειών, την επαλήθευση ιχνηθετών και την αποθήκευση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται καθιερωμένες διαδικασίες. Για κάθε κατεψυγμένο παρασκεύασμα έτοιμης καλλιέργειας θα πρέπει να καταδεικνύεται ότι απαιτεί αμινοξύ για να αναπτυχθεί (ιστιδίνη για στελέχη *S. typhimurium* και θρυπτοφάνη για στελέχη *E. coli*). Θα πρέπει ομοίως να ελέγχονται προς επιβεβαίωση και άλλα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, συγκεκριμένα: η παρουσία ή απουσία πλασμιδίων R-παραγόνα όπου χρειάζεται [δηλ. αντίσταση αμικικιλίνης σε στελέχη TA98, TA100 και TA97a ή TA97, WP2 unvA και WP2 unvA (pKM101), και αντίσταση αμικικιλίνης + τετρακυκλίνης σε στέλεχος TA102], η παρουσία χαρακτηριστικών μεταλλάξεων (δηλ. rfa μετάλλαξη σε *S. typhimurium* μέσω της ευαισθησίας σε κρυσταλλικό ιώδες και unvA μετάλλαξη σε *E. coli* ή unvB μετάλλαξη σε *S. typhimurium* μέσω της ευαισθησίας σε υπεριώδες φως) (2)(3). Τα στελέχη θα πρέπει επίσης να δίνουν έναν αριθμό αυθόρμητων ανάστροφων αποικιών σε τρυβλίο που να πέφτει μέσα στις περιοχές συχνοτήτων που αναμένονται από τα προϋπάρχοντα εργαστηριακά δεδομένα και, κατά προτίμηση, μέσα στην περιοχή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

1.5.1.2 Θρεπτικό μέσο

Χρησιμοποιείται κατάλληλο ελάχιστο άγαρ (π.χ. άγαρ που περιέχει ελάχιστο μέσο E Vogel-Bonner και γλυκόζη) και άγαρ επίστρωσης που περιέχει ιστιδίνη και βιοτίνη ή θρυπτοφάνη για να μπορούν να γίνουν μερικές κυτταρικές διαιρέσεις (1)(2)(9).

1.5.1.3 Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα βακτήρια θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία κατάλληλου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπράγοντα (S9) που παρασκευάζεται από το ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως το Aroclor 1254 (1)(2) ή μίγμα φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (18)(20)(21). Το μεταμιτοχονδριακό κλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 5 έως 30% v/v στο S9-μίγμα. Η επιλογή και κατάσταση ενός συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης μπορεί να εξαρτάται από την τάξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία συγκεντρώσεις μεταμιτοχονδριακού κλάσματος. Στην περίπτωση των αζωχρωμάτων και των αζωενώσεων, μπορεί να είναι καλύτερα να χρησιμοποιηθεί αναγωγικό σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (6)(13).

1.5.1.4 Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται εφόσον απαιτείται πριν από την κατεργασία των βακτηρίων. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα συστήματα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την κατεργασία. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στοιχεία επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

Δεν πρέπει να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του διαλύτη/φορέα με την υπό δοκιμή ουσία ενώ θα πρέπει να είναι συμβατός με την επιβίωση των βακτηρίων και τη δραστηριότητα S9 (22). Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα. Όταν εξετάζονται ουσίες που δεν είναι σταθερές στο νερό, οι χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι ύδατος.

1.5.2 Συνθήκες δοκιμής

1.5.2.1 Υπό δοκιμή στελέχη (βλ. 1.5.1.1)

1.5.2.2 Συγκέντρωση εκθέσεως

Μεταξύ των κριτηρίων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη για τον καθορισμό της μέγιστης για χρήση ποσότητας υπό δοκιμή ουσίας είναι η κυτταροτοξικότητα και η διαλυτότητα στο τελικό μίγμα κατεργασίας.

Μπορεί να είναι σκόπιμο να προσδιοριστεί η τοξικότητα και η δυσδιαλυτότητα με μία προκαταρκτική δοκιμή. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να βρεθεί από τη μείωση του αριθμού των ανάστροφων αποικιών, το μηδενισμό ή την ελάττωση του υποστρώματος ή το βαθμό επιβίωσης των εξεταζομένων καλλιιεργειών. Η κυτταροτοξικότητα μιας ουσίας μπορεί να μεταβληθεί παρουσία συστημάτων μεταβολικής ενεργοποίησης. Η δυσδιαλυτότητα θα πρέπει να εκτιμάται με βάση την πτώση ιζήματος στο τελικό μίγμα υπό τις πραγματικές συνθήκες δοκιμής που είναι εμφανής με γυμνό οφθαλμό.

Η συνιστώμενη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής για διαλυτές μη κυτταροτοξικές ουσίες είναι 5 mg/τροβλίο ή 5 μl/τροβλίο. Για μη κυτταροτοξικές ουσίες που δεν είναι διαλυτές σε επίπεδα συγκεντρώσεως 5 mg/τροβλίο ή 5 μl/τροβλίο, μία ή περισσότερες από τις χρησιμοποιούμενες στη δοκιμή συγκεντρώσεις θα πρέπει να καθιστούν την ουσία αδιάλυτη στο τελικό μίγμα κατεργασίας. Οι υπό δοκιμή ουσίες που είναι κυτταροτοξικές ήδη από επίπεδα συγκεντρώσεως κάτω των 5 mg/τροβλίο ή 5 μl/τροβλίο θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή μέχρι του επιπέδου της κυτταροτοξικής συγκέντρωσης. Το ίζημα δεν θα πρέπει να παρεμβαίνει στην εκτίμηση.

Στα αρχικά πειράματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον πέντε διαφορετικές αναλύσιμες συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας με ημιλογαριθμικά περίπου διαστήματα (δηλ. $\sqrt{10}$) μεταξύ των σημείων δοκιμής. Όταν διερευνάται η σχέση συγκέντρωσης/απόκρισης, μπορεί να είναι σκόπιμο να χρησιμοποιηθούν μικρότερα διαστήματα. Όταν αξιολογούνται ουσίες που περιέχουν σημαντικές ποσότητες δυνητικά μεταλλαξογόνων προσμείξεων, μπορεί να εξεταστεί και η διενέργεια δοκιμής σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τα 5 mg/τροβλίο ή 5 μl/τροβλίο.

1.5.2.3 Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα και καλλιέργειες με εξειδικευμένους για το στέλεχος θετικούς και αρνητικούς (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Θα πρέπει να επιλέγονται συγκεντρώσεις θετικών μαρτύρων που αποδεικνύουν την αποτελεσματικότητα κάθε δοκιμής.

Σε δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιείται σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης, ο ή οι θετικοί μάρτυρες αναφοράς θα πρέπει να επιλέγονται με βάση το είδος των χρησιμοποιούμενων βακτηριακών στελεχών.

Παραδείγματα κατάλληλων θετικών μαρτύρων για δοκιμές με μεταβολική ενεργοποίηση αποτελούν οι παρακάτω ουσίες

Αριθμοί CA	Αριθμοί EINECS	Ονομασία
781-43-1	212-308-4	9,10-διμεθυλανθρακένιο
57-97-6	200-359-5	7,12-διμεθυλοβενζ[α]ανθρακένιο
50-32-8	200-028-5	βενζο[α]πυρένιο
613-13-8	210-330-9	2-αμινοανθρακένιο
50-18-0	200-015-4	κυκλοφωσφαμίδιο
6055-19-2		μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο

Η παρακάτω ουσία είναι ένας κατάλληλος θετικός μάρτυρας για τη μέθοδο αναγωγικής μεταβολικής ενεργοποίησης:

573-58-0

209-358-4

Ερυθρό του Κονγκό

Το 2-αμινοανθρακένιο δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως αποκλειστικός δείκτης της αποτελεσματικότητας του S9-μίγματος. Εάν χρησιμοποιηθεί 2-αμινοανθρακένιο, κάθε παρτίδα S9 θα πρέπει να χαρακτηρίζεται και με ένα μεταλλαξογόνο που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση από μικροσωμικά ένζυμα, π.χ. βενζο[α]πυρένιο, διμεθυλοβενζανθρακένιο.

Οι ουσίες που ακολουθούν αποτελούν παραδείγματα εξειδικευμένων κατά στέλεχος θετικών μαρτύρων για δοκιμές που εκτελούνται χωρίς εξωγενές σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης:

Αριθμοί CAS	Αριθμοί EINECS	Ονομασία	Στέλεχος
26628-22-8	247-852-1	αζίδιο του νατρίου	TA 1535 και TA 100
607-57-8	210-138-5	2-νιτροφλουορένιο	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-αμινοακρίδίνη	TA 1537, TA 97 και TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 και TA 97a
80-15-9	201-254-7	υδροπεροξειδίο του κουμηνίου	TA 102
50-07-7	200-008-6	μιτομυκίνη C	WP2 unvA και TA102
70-25-7	200-730-1	N-αιθυλο-N-νιτρο-N-νιτροζογουανιδίνη	WP2, WP2unvA και WP2unvA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-νιτροκινολιν-1-οξειδίο	WP2, WP2unvA και WP2unvA(pKM101)
3688-53-7		φουρλοφουραμίδιο (AF2)	στελέχη περιέχοντα πλασμίδιο

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες κατάλληλες ουσίες. Εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να εξετάζεται η δυνατότητα χρήσης ως θετικών μαρτύρων ουσιών σχετικής χημικής τάξης

Θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, αποτελούμενοι από μόνο τον διαλύτη ή φορέα στο μέσο, χωρίς την υπό δοκιμή ουσία, και υποβαλλόμενοι στην ίδια κατεργασία με εκείνη των υπό δοκιμή καλλιιεργειών. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε κατεργασία μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν πρότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξογόνα αποτελέσματα.

1.5.3 Διαδικασία

Στη μέθοδο της προσθήκης σε τρυβλίο (1)(2)(3)(4), χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0.05 ml ή 0.1 ml των διαλυμάτων δοκιμής, 0.1 ml πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και 0.5 ml στείρου ρυθμιστικού διαλύματος 2.0 ml άγαρ επιστροφής. Στη δοκιμή με μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0.5 ml μίγματος μεταβολικής ενεργοποίησης που περιέχει κατάλληλη ποσότητα μεταμιτοχονδριακού κλάσματος (της τάξεως του 5 έως 30% v/v στο μίγμα μεταβολικής ενεργοποίησης) με το άγαρ επιστροφής (2.0 ml), μαζί με τα βακτήρια και την ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα ανακατεύεται και φέρεται στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Το άγαρ επιστροφής αφήνεται να στερεοποιηθεί πριν από την επώαση.

Στη μέθοδο της επώασης (2)(3)(5)(6), η ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής προεπώαζεται με το υπό δοκιμή στέλεχος (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και στείρο ρυθμιστικό διάλυμα ή το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (0.5 ml) συνήθως για 20 min. ή και περισσότερο στους 30-37°C πριν να αναμειχθεί με το άγαρ επιστροφής και να επιστρωθεί στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Συνήθως, 0.05 ή 0.1 ml της υπό δοκιμή ουσίας/διαλύματος δοκιμής, 0.1 ml βακτηρίων και 0.5 ml S9-μίγματος ή στείρου ρυθμιστικού αναμειγνύονται με 2,0 ml άγαρ επιστροφής. Οι σωλήνες, κατά τη διάρκεια της προεπώασης, θα πρέπει να αερίζονται με τη χρήση αναταράκτη.

Για τη σωστή εκτίμηση της διακύμανσης, σε κάθε επίπεδο δόσεως θα πρέπει να χρησιμοποιείται τριπλή επίστρωση. Εφόσον αιτιολογείται επιστημονικώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και διπλή επίστρωση. Τυχαία απώλεια τρυβλίου δεν καθιστά κατ' ανάγκη άκυρη τη δοκιμή.

Αέριες ή πτητικές ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή με κατάλληλες μεθόδους, όπως π.χ. σε σφραγισμένα δοχεία (12)(14)(15)(16).

1.5.4 Επώαση

Όλα τα τρυβλία σε μία δεδομένη δοκιμή θα πρέπει να επωάζονται στους 37°C για 48-72 hours. Μετά την περίοδο επώασης, μετράται ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα θα πρέπει να παρουσιάζονται ως ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο. Θα πρέπει επίσης να δίνεται και ο αριθμός των ανάστροφων αποικιών στα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός (διαλύτης-μάρτυρας και μη υποβληθείς σε κατεργασία μάρτυρας, εφόσον χρησιμοποιείται) και θετικός μάρτυρας. Για την υπό δοκιμή ουσία καθώς και για τον θετικό και αρνητικό (μη κατεργασθείς και/ή διαλύτης) μάρτυρα θα πρέπει να δίνονται στοιχεία με τους επιμέρους κατά τρυβλίο αριθμούς, το μέσο αριθμό των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο και την τυπική απόκλιση.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών αποκρίσεων. Τυχόν διαφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να αποσαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας κατά προτίμηση τις πειραματικές συνθήκες. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται περίπτωση προς περίπτωση. Στις περιπτώσεις όπου δεν θεωρείται αναγκαία η επιβεβαίωση των αρνητικών αποτελεσμάτων, θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Στα επαναληπτικά πειράματα θα πρέπει να εξετάζεται η τροποποίηση των παραμέτρων της δοκιμής ώστε να καλύπτουν όλη την έκταση των εκτιμώμενων συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιηθούν περιλαμβάνεται το εύρος της συγκέντρωσης, η μέθοδος κατεργασίας (προσθήκη σε τρυβλίο ή προεπόαση σε υγρό περιβάλλον) και οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό εφαρμόζονται διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση αύξηση στην περιοχή δοκιμής και/ή μία αναπαραγώγιμη αύξηση υπό μία ή περισσότερες συγκεντρώσεις στον αριθμό των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο σε ένα τουλάχιστον στέλεχος με ή χωρίς σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (23). Θα πρέπει να εξετάζεται πρώτα η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι [24]. Εντούτοις, σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξογόνος στο σύστημα αυτό.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστηριότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διαφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από τη δοκιμή βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει σημειακές μεταλλάξεις με υποκαταστάσεις βάσεων ή αλλαγές πλασιού στο γονιδίωμα της *Salmonella typhimurium* και/ή *Escherichia coli*. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι μεταλλαξογόνος στο εξεταζόμενο είδος.

3.

ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/Φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη/φορέα,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές,

Στελέχη:

- χρησιμοποιηθέντα στελέχη,
- αριθμό κυττάρων ανά καλλιέργεια,
- χαρακτηριστικά των στελεχών.

Συνθήκες δοκιμής:

- ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας ανά τρυβλίο (mg/τρυβλίο ή μl/τρυβλίο) με αιτιολόγηση της επιλογής της δόσεως και του αριθμού των τρυβλίων ανά συγκέντρωση
- χρησιμοποιηθέν θρεπτικό μέσο
- τύπο και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και των κριτηρίων αποδοχής,
- διαδικασίες κατεργασίας.

Αποτελέσματα:

- σημάδια τοξικότητας,
- σημάδια καθίζησης,
- επιμέρους κατά τρυβλίο αποτελέσματα μετρήσεων,
- το μέσο αριθμό των ανάστροφων αποικιών ανά τρυβλίο και την τυπική απόκλιση,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,
- στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,
- παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,
- προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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.
2. Maron, D.M. and 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. and 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. and 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. and 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. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
7. Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
8. Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 167-177.
9. Green, M.H.L., Muriel, W.J. and 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. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.
11. Thompson, E.D. and 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. and 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. and 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. and 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. and Tardiff, R.G. (1977). Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water. In Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

16. Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and 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., and 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. and 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. and 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. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems. In: "*In Vitro* metabolic Activation in Mutagenesis Testing" Eds. F.J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.
21. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
22. Maron, D., Katzenellenbogen, J. and 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. and 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. and 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. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B. 15

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Μια ποικιλία απλοειδών και διπλοειδών στελεχών του μύκη *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της παραγωγής των μεταλλάξων γονιδίων που προκαλούνται με χημικά μέσα, με μεταβολική ενεργοποίηση και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

Έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα πρόσω μετάλλαξης σε απλοειδή στελέχη, όπως είναι η μέτρηση της μετάλλαξης από ερυθρά μεταλλαχθέντα στελέχη που απαιτούν αδενίνη (*ade-1*, *ade-2*), σε λευκά μεταλλαχθέντα στελέχη που απαιτούν διπλή αδενίνη καθώς και επίλεκτικά συστήματα, όπως είναι η επαγωγή αντίστασης σε καναβανίνη και κυκλοεξιμίδιο.

Το ευρύτερα επιβεβαιωμένο σύστημα αντίστροφης μετάλλαξης περιλαμβάνει χρήση του απλοειδούς στελέχους XV 185-14 C, το οποίο μεταφέρει τις ασυνθετικές μεταλλάξεις *ochre-ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* και *trp 5-48*, που είναι αντιστρέψιμες από μεταλλαξιγόνα υποκατάστασης βάσης, τα οποία προκαλούν ειδικές μεταλλάξεις θέσεων ή μεταλλάξεις αναστολέα ώχρας. Το XV 185-14 C φέρει επίσης τον δείκτη *his 1-7*, μία δυσυνθετική μετάλλαξη που ανιστρέφεται κυρίως από μεταλλάξεις δεύτερης θέσης, και τον δείκτη *hom 3-10*, ο οποίος ανιστρέφεται από μεταλλαξιγόνα μετατόπισης πλαισίου.

Στα διπλοειδή στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae*, το μόνο ευρέως χρησιμοποιούμενο στέλεχος είναι το D₇, το οποίο είναι ομόζυγο ως προς το *ilv 1-92*.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Πρέπει να παρασκευαστούν διαλύματα των δοκιμαζόμενων χημικών ουσιών και των ουσιών ελέγχου ή αναφοράς λίγο πριν από τη δοκιμασία, με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Για υδροφобες οργανικές ενώσεις πρέπει να χρησιμοποιηθεί διάλυμα μέχρι 2% κατ' όγκο σε οργανικούς διαλύτες όπως η αιθανόλη, η ακετόνη και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στις δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες, τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης. Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα συνεργό μεταμιτοχονδριακό κλάσμα από το ήπαρ τρωκτικών που έχουν υποστεί προηγούμενα αγωγή με παράγοντες που επάγουν ένζυμα. Η χρήση άλλων ειδών, οργανισμών, ιστών, μεταμιτοχονδριακών κλασμάτων ή διαδικασιών μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για μεταβολική ενεργοποίηση.

Συνθήκες δοκιμασίας

Στελέχη δοκιμασιών

Το απλοειδές στέλεχος XV 185-14 C και το διπλοειδές στέλεχος D₂ είναι τα στελέχη που χρησιμοποιούνται περισσότερο σε μελέτες σημαϊκής μετάλλαξης. Άλλα στελέχη μπορούν επίσης να είναι κατάλληλα.

Μέσον καλλιέργειας

Προσφύες μέσον καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης κυττάρων και του αριθμού των μεταλλαχθέντων στελεχών.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων

Εκτελούνται συγχρόνως με τη δοκιμασία θετικοί έλεγχοι, έλεγχοι χωρίς προηγούμενη αγωγή και έλεγχοι διαλυτών. Χρησιμοποιούνται κατάλληλες χημικές ουσίες θετικού ελέγχου για κάθε ειδικό τελικό σημείο μετάλλαξης.

Συγκέντρωση έκθεσης

Χρησιμοποιούνται πέντε τουλάχιστον κατάλληλα καταμεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Για τοξικές ουσίες, η υψηλότερη δοκιμαζόμενη συγκέντρωση δεν πρέπει να μειώνει την επιβίωση κάτω από 5 έως 10%. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους, με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για τις πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση καθορίζεται κατά περίπτωση.

Συνθήκες επώασης

Οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο επωάζονται τέσσερις έως επτά ημέρες σε θερμοκρασία 28 έως 30 °C σε συνθήκες σκότους.

Συχνότητες αυθόρμητης μετάλλαξης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υποκαλλιέργειες με συχνότητες αυθόρμητης μετάλλαξης μέσα στα αποδεκτά κανονικά πλαίσια.

Αριθμός επαναλήψεων

Τρεις τουλάχιστον διπλές καλλιέργειες πρέπει να χρησιμοποιούνται για κάθε συγκέντρωση για τη δοκιμασία των πρωτοτροφικών στελεχών που παράγονται από τη μετάλλαξη γονιδίων και για τη βιοσιμότητα των κυττάρων.

Στην περίπτωση πειραμάτων με τη χρήση δεικτών, όπως είναι ο hom 3-10 με χαμηλό ρυθμό μετάλλαξης, ο αριθμός των χρησιμοποιούμενων καλλιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να αυξηθεί για να δώσει αποτελέσματα σημαντικά από στατιστική άποψη.

Διαδικασία

Η κατεργασία των στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae* γίνεται συνήθως με διαδικασία υγρού θρεπτικού υλικού που περιλαμβάνει στάσιμα ή βλαστάριοντα κύτταρα. Προκαταρκτικά πειράματα πρέπει να γίνονται σε βλαστάριοντα κύτταρα: $1 - 5 \times 10^7$ κύτταρα/ml εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία μέχρι 18 ώρες σε θερμοκρασία 28 έως 37 °C, με ανάδευση. Προστίθεται επαρκής ποσότητα μικροσωμικού κλάσματος κατά τη διάρκεια της κατεργασίας, όταν επιβάλλεται. Στο τέλος της κατεργασίας, τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται, πλένονται και εμψυτεύονται σε κατάλληλο υλικό καλλιέργειας.

Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο καταμετρούνται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης και της προκληθείσης μετάλλαξης γονιδίων.

Εάν το πρώτο πείραμα είναι αρνητικό, ένα δεύτερο πείραμα πρέπει να γίνει με κύτταρα στάσιμα. Εάν το πρώτο πείραμα είναι θετικό αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί σ' ένα κατάλληλο ανεξάρτητο πείραμα.

2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα που δίνει τον αριθμό των αποικιών που καταμετρήθηκαν, τον αριθμό των μεταλλαχθέντων στελεχών, την επιβίωση και τη συχνότητα των μεταλλαχθέντων στελεχών. Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ένα ανεξάρτητο πείραμα. Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμούνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε,
- συνθήκες δοκιμασίας: κύτταρα σε στάσιμη φάση ή σε βλάστηση, σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, θερμοκρασία και διάρκεια επώασης, συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης,
- συνθήκες αγωγής: επίπεδα έκθεσης, διαδικασία και διάρκεια αγωγής, θερμοκρασία αγωγής, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,
- αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν, αριθμός μεταλλαχθέντων στελεχών, επιβίωση και συχνότητα μεταλλαχθέντων στελεχών, σχέση δόσης/αποτελέσματος, αν μπορεί να εφαρμοστεί, στατιστική εκτίμηση των δεδομένων,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 16

ΜΙΤΩΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ — SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Ο μιτωτικός ανασυνδυασμός στον *Saccharomyces cerevisiae* μπορεί να ανιχνευθεί ανάμεσα στα γονίδια (ή συνθεττερα ανάμεσα σε ένα γονίδιο και το κεντρομερίδιό του) καθώς επίσης και μέσα στα γονίδια. Το πρώτο φαινόμενο καλείται μιτωτικός επιχιασμός και παράγει αντίστοιχα προϊόντα, ενώ το τελευταίο είναι συχνότερα μη αντίστοιχο και καλείται μεταστροφή γονιδίων. Ο επιχιασμός δοκιμάζεται συνήθως με την παραγωγή υπολειπόμενων ομοζύγων αποικιών ή τομέων που παράγονται σε ένα ετερόζυγο στέλεχος, ενώ η μεταστροφή γονιδίων δοκιμάζεται με την παραγωγή πρωτοτροφικών αναστροφών που παράγονται σε ένα αυξοτροφικό ετεροαλληλομορφικό στέλεχος που φέρει δύο διαφορετικά ελαττωματικά αλληλόμορφα του ίδιου γονιδίου. Τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα στελέχη για την ανίχνευση της μιτωτικής μεταστροφής γονιδίων είναι τα D_1 (ετεροαλληλόμορφα σε *ade 2* και *trp 5*), το D_2 (ετεροαλληλόμορφα σε *trp 5*) και το $JD 1$ (ετεροαλληλόμορφα σε *his 4* και *trp 5*) και το BZ_{14} (ετεροαλληλόμορφα, σε *arg 4*). Ο μιτωτικός επιχιασμός που παράγει ερυθρούς και ροδόχρους ομόζυγους τομείς μπορεί να δοκιμασθεί στο D_2 ή στο D_1 (το οποίο επίσης μετρά την μιτωτική μετατροπή γονιδίων και την αντίστροφη μετάλλαξη σε *inv 1-92*). Και τα δύο στελέχη στην περίπτωση αυτή είναι ετεροαλληλόμορφα ως προς συμπληρωματικά αλληλόμορφα του *ade 2*.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Τα διαλύματα των δοκιμαζομένων χημικών ουσιών και των μαρτύρων ή ουσιών ελέγχου και αναφοράς πρέπει να παρασκευάζονται λίγο πριν από τη δοκιμασία, με τη χρήση κατάλληλου φορέα. Για υδρόφοβες οργανικές ενώσεις πρέπει να χρησιμοποιείται διάλυμα μέχρι 2% κατ' όγκο σε οργανικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη, η ακετόνη και το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα εκτίθενται στις δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες, τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης.

Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα ενεργό μεταμιτοχονδριακό κλάσμα από το ήπαρ τρωκτικών που έχουν υποστεί προηγούμενη αγωγή με παράγοντες που εγείνουν ένζυμα. Η χρήση άλλων ειδών οργανισμών, ιστών, μεταμιτοχονδριακών κλασμάτων ή διαδικασιών μπορεί επίσης να είναι κατάλληλη για μεταβολική ενεργοποίηση.

Συνθήκες δοκιμασίας

Στελέχη δοκιμασιών

Τα συχνότερα χρησιμοποιούμενα στελέχη είναι τα διπλοειδή D_1 , D_2 και $JD 1$. Η χρήση και άλλων στελεχών μπορεί να είναι κατάλληλη.

Μέσον καλλιέργειας

Προσφύε μέσον καλλιέργειας χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης και της συχνότητας του μιτωτικού ανασυνδυασμού.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να εκτελούνται συγχρόνως με τη δοκιμασία θετικοί έλεγχοι, έλεγχοι χωρίς προηγούμενη αγωγή και έλεγχοι διαλυτών με μάρτυρες. Για κάθε τελικό σημείο ανασυνδυασμού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες χημικές ουσίες σαν θετικοί μάρτυρες.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν πέντε τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Μεταξύ των παραγόντων που πρέπει να ληφθούν υπόψη είναι η κυτταροτοξικότητα και η διαλυτότητα. Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις δεν πρέπει να έχουν καμία επίδραση στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Για τις τοξικές χημικές ουσίες, η υψηλότερη χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση δεν πρέπει να μειώνει την επιβίωση κάτω από 5 έως 10%. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές χημικές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι τα όρια διαλυτότητας, με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για τις πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές χημικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση του πειράματος πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Τα κύτταρα μπορούν να εκτίθενται σε δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες είτε σε στάση φάση είτε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, για περιόδους μέχρι 18 ωρών. Ωστόσο, για μακρές περιόδους αγωγής, οι καλλιέργειες πρέπει να επθεωρούνται μικροσκοπικά για τον σχηματισμό σπορίων, η παρουσία των οποίων αχρηστεύει το πείραμα.

Συνθήκες επώασης

Οι καλλιέργειες επώαζονται στο σκοτάδι επί τέσσερις έως επτά ημέρες, σε 28 έως 30 °C. Οι καλλιέργειες αυτές που χρησιμοποιούνται για τη δοκιμή των ερυθρών και ροδόχρων ομοζύγων τομέων που παράγονται από μιτωτικό επιχιασμό, πρέπει να διατηρούνται σε ψυγείο (4 °C) για μία έως δύο ημέρες πριν από την καταμέτρηση, έτσι ώστε να αναπτυχθούν οι κατάλληλες χρωματισμένες αποικίες.

Συχνότητες αυθόρμητου μιτωτικού ανασυνδυασμού

Πρέπει να χρησιμοποιούνται υποκαλλιέργειες με συχνότητες αυθόρμητου μιτωτικού ανασυνδυασμού μέσα σε αποδεκτά κανονικά πλαίσια.

Αριθμός επαναλήψεων

Ένα ελάχιστο όριο τριών επαναλήψεων μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να χρησιμοποιείται ανά συγκέντρωση για το πείραμα των πρωτοτροφικών που παράγονται από μιτωτική μεταστροφή γονιδίων καθώς και για τη βιωσιμότητα. Στην περίπτωση της δοκιμασίας των υπολειπόμενων ομοζυγών που παράγονται από μιτωτικό επιχιασμό, ο αριθμός καλλιεργιών μέσα σε αγάρ αγάρ σε τριβλίο πρέπει να αυξηθεί ώστε να υπάρξει ικανός αριθμός αποικιών.

Διαδικασία

Η αγωγή των στελεχών του *Saccharomyces cerevisiae* εκτελείται συνήθως μέσα σε υγρό με στάση ή αναπτυσσόμενα κύτταρα. Προκαταρκτικά πειράματα πρέπει να γίνονται με αναπτυσσόμενα κύτταρα. $1-5 \times 10^7$ κύτταρα/ml εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία μέχρι 18 ώρες, σε 28 ° έως 37 °C, με ανάδευση. Κατά τη διάρκεια της αγωγής προστίθεται επαρκής ποσότητα μικροσωμικού κλάσματος όταν επιβάλλεται. Κατά το τέλος της αγωγής, τα κύτταρα φυγοκεντρούνται, πλένονται και εμψυτεύονται σε κατάλληλο υλικό καλλιέργειας. Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες μέσα σε αγάρ αγάρ καταμετρώνται για προσδιορισμό επιβίωσης και επαγωγής μιτωτικού ανασυνδυασμού. Εάν το πρώτο πείραμα είναι αρνητικό, τότε ένα δεύτερο πείραμα πρέπει να γίνει με στάση κύτταρα. Εάν το πρώτο πείραμα είναι θετικό, αυτό πρέπει να επιβεβαιώνεται σε κατάλληλο ανεξάρτητο πείραμα.

2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακος, ο οποίος δίνει τον αριθμό των αποικιών που καταμετρήθηκαν, τον αριθμό των στελεχών ανασυνδυασμού, την επιβίωση και τη συχνότητα των στελεχών ανασυνδυασμού. Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται αν είναι δυνατό με ανεξάρτητο πείραμα. Η εκτίμηση των δεδομένων γίνεται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση του πειράματος πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε,
- συνθήκες δοκιμασίας: κύτταρα σε στάσιμη φάση ή σε φάση ανάπτυξης, σύνθεση του μέσου καλλιέργειας, θερμοκρασία και διάρκεια επώασης, σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης,
- συνθήκες αγωγής: συγκέντρωση ουσίας έκθεσης, διαδικασία και διάρκεια αγωγής, θερμοκρασία αγωγής, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,
- Αριθμός των αποικιών που καταμετρήθηκαν, αριθμός των στελεχών ανασυνδυασμού, επιβίωση και συχνότητα ανασυνδυασμού, σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν μπορεί να εφαρμοστεί, στατιστική αξιολόγηση των δεδομένων,
- σύζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 17. ΜΕΤΑΛΛΑΞΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑ– *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ

ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *in vitro* δοκιμή κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης στα θηλαστικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Στις κατάλληλες κυτταρικές σειρές περιλαμβάνονται L5178Y λεμφωματικά κύτταρα ποντικού, οι CHO, CHO-ASS2 και V79 σειρές κυττάρων κινέζικου κρικητού και TK6 ανθρώπινα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα (1). Στις κυτταρικές αυτές σειρές τα συνθέστερα χρησιμοποιούμενα γενετικά τελικά σημεία μετρούν μετάλλαξη σε θυμιδινο κινάση (TK) και φωσφοριβοζύλο τρανσφεράση υποξανθίνης-γουανίνης (HPRT) καθώς και ένα διαγονίδιο φωσφοριβοζύλο τρανσφεράσης ξανθίνης-γουανίνης (XPRT). Οι δοκιμές μετάλλαξης TK, HPRT και XPRT ανιχνεύουν διάφορα φάσματα γενετικών συμβάντων. Το γεγονός ότι οι TK και XPRT βρίσκονται σε αυτοσώματα μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση γενετικών συμβάντων (π.χ. μεγάλες απαλείψεις) που δεν ανιχνεύονται στο γενετικό τόπο HPRT σε X-χρωμοσώματα (2)(3)(4)(5)(6).

Στην *in vitro* δοκιμή κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης σε θηλαστικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν καλλιέργειες καθυρωμένων κυτταρικών σειρών ή κυτταρικών στελεχών. Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα επιλέγονται με βάση την ικανότητα ανάπτυξής τους σε καλλιέργεια και τη σταθερότητα της συχνότητας αυθόρμητης μετάλλαξης.

Στις δοκιμές που διεξάγονται *in vitro* απαιτείται εν γένει η χρήση εξωγενούς πηγής μεταβολικής ενεργοποίησης. Το σύστημα αυτό μεταβολικής ενεργοποίησης δεν μπορεί να μιμηθεί εξ ολοκλήρου τις *in vivo* συνθήκες των θηλαστικών. Πρέπει να λαμβάνεται πρόνοια ώστε να αποφεύγονται συνθήκες που μπορεί να οδηγήσουν στη λήψη αποτελεσμάτων τα οποία δεν αντιπροσωπεύουν εγγενή μεταλλαξογενετικότητα. Θετικά αποτελέσματα που δεν αντικατοπτρίζουν εγγενή μεταλλαξογενετικότητα μπορεί να προέρχονται από αλλαγές στο pH, την οσμωμοριακότητα ή υψηλά επίπεδα κυτταροτοξικότητας (7).

Η παρούσα δοκιμή χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό πιθανών μεταλλαξογόνων και καρκινογόνων στα θηλαστικά. Πολλές ενώσεις που εμφανίζονται θετικές στην παρούσα δοκιμή είναι καρκινογόνες για τα θηλαστικά. Εντούτοις, δεν υπάρχει απόλυτη συσχέτιση μεταξύ αυτής της δοκιμής και του φαινομένου της καρκινογενετικότητας. Η συσχέτιση εξαρτάται από τη χημική τάξη και υπάρχουν άξουσες ενδείξεις ότι υπάρχουν καρκινογόνα που δεν ανιχνεύονται από τη δοκιμή αυτή γιατί δρουν μέσω άλλων, μη γονοτοξικών μηχανισμών ή μηχανισμών που απουσιάζουν στα βακτηριακά κύτταρα (6).

Βλ. επίσης Γενική εισαγωγή Μέρος Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Εξελικτική μετάλλαξη: γονιδιακή μετάλλαξη από το γονικό τύπο προς το προϊόν μετάλλαξης που προκαλεί αλλοίωση ή απώλεια της ενζυματικής δραστηριότητας της λειτουργίας της κωδικοποιημένης πρωτεΐνης.

Μεταλλαξογόνα υποκατάστασης ζευγών βάσεων: ουσίες που προκαλούν υποκατάσταση ενός ή περισσότερων ζευγών βάσεων στο DNA.

Μεταλλαξογόνα αλλαγής πλαισίου: Ουσίες που προκαλούν προσθήκη ή απώλιση ενός ή πολλών ζευγών βάσεων στο μόριο DNA.

Χρόνος φαινοτυπικής έκφρασης: περίοδος κατά την οποία μη αλλοιωμένα γονιδιακά προϊόντα υφίστανται μείωση από νεοστί μεταλλαγμένα κύτταρα.

Συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης: ο αριθμός των παρατηρουμένων μεταλλαγμένων κυττάρων δια του αριθμού βιώσιμων κυττάρων.

Σχετική συνολική ανάπτυξη: αύξηση του αριθμού των κυττάρων με το χρόνο σε σύγκριση με ένα κυτταρικό πληθυσμό-μάρτυρα. Υπολογίζεται ως το γινόμενο της ανάπτυξης εναιωρήματος σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα επί την αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Σχετική ανάπτυξη εναιωρήματος: αύξηση του αριθμού των κυττάρων κατά την περίοδο έκφρασης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Βιωσιμότητα: η αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης των κατεργασμένων κυττάρων στο χρόνο της επίστρωσης σε τρυβλίο υπό επιλεκτικές συνθήκες μετά την περίοδο έκφρασης.

Επιβίωση: η αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης των κατεργασμένων κυττάρων όταν επιστρέφονται σε τρυβλίο στο τέλος της περιόδου κατεργασίας. Η επιβίωση εκφράζεται συνήθως σε σχέση με την επιβίωση του κυτταρικού πληθυσμού-μάρτυρα.

1.3

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα κύτταρα που παρουσιάζουν έλλειψη θυμιδινό κινάσης (TK) λόγω της μετάλλαξης TK^{+/+} -> TK^{-/-} παρουσιάζουν αντίσταση στην κυτταροτοξική επίδραση του πυριμιδινικού αναλόγου τριφθοροθυμιδίνη (TFT). Τα κύτταρα με θυμιδινό κινάση είναι ευαίσθητα στην TFT, πράγμα το οποίο εμποδίζει τον κυτταρικό μεταβολισμό και σταματάει την περαιτέρω κυτταρική διαίρεση. Έτσι, τα μεταλλαγμένα κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιάζονται παρουσία TFT, ενώ τα κανονικά κύτταρα, τα οποία περιέχουν θυμιδινοκινάση, δεν μπορούν. Ομοίως, κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν έλλειψη σε HPRT ή XPRTR επιλέγονται επειδή παρουσιάζουν αντίσταση στην 6-θειογουανίνη (TG) ή 8-αζαγουανίνη (AG). Εάν σε κάποια από τις δοκιμές κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης σε θηλαστικά υποβάλλεται σε δοκιμή ανάλογη βάση ή ένωση σχετική με τον παράγοντα επιλογής, θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά οι ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας. Για παράδειγμα, θα πρέπει να διερευνάται οποιαδήποτε τυχόν υπόνοια επιλεκτικής τοξικότητας της υπό δοκιμή ουσίας έναντι των μεταλλαγμένων και μη κυττάρων. Κατά την υποβολή λοιπόν σε δοκιμή χημικών ουσιών που έχουν σχέση από πλευράς δομής με τον παράγοντα επιλογής, θα πρέπει να επιβεβαιώνεται η απόδοση του συστήματος επιλογής/παράγοντα (8).

Τα υπό μορφή εναιωρήματος ή μονοστρωματικής καλλιέργειας κύτταρα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία, με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, για κατάλληλο χρονικό διάστημα και κατόπιν φέρονται σε υποκαλλιέργειες για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας και για να επιτραπεί η φαινοτυπική έκφραση πριν από την επιλογή των προϊόντων μετάλλαξης (9)(10)(11)(12)(13). Η κυτταροτοξικότητα προσδιορίζεται συνήθως μετρώντας τη σχετική αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης (επιβίωση) ή τη σχετική συνολική ανάπτυξη των καλλιεργειών μετά την περίοδο κατεργασίας. Οι κατεργαζόμενες καλλιέργειες διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο για ικανό χρονικό διάστημα που είναι χαρακτηριστικό για κάθε επιλεγμένο γενετικό τόπο και κυτταρικό τύπο, ώστε να μπορέσει να επιτευχθεί η άριστη δυνατή φαινοτυπική έκφραση των προκληθεισών μεταλλάξεων. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης προσδιορίζεται ανακαλλιερτώντας γνωστούς αριθμούς κυττάρων σε θρεπτικό μέσο που περιέχει τον παράγοντα επιλογής για την ανίχνευση μεταλλαγμένων κυττάρων και σε θρεπτικό μέσο χωρίς παράγοντα επιλογής για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης (βιωσιμότητα). Έπειτα από κατάλληλο χρόνο επώασης, μετρώνται οι αποικίες. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης εξάγεται από τον αριθμό των μεταλλαγμένων αποικιών στο μέσο επιλογής και τον αριθμό των αποικιών σε μη επιλεκτικό μέσο..

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1 Προετοιμασίες

1.4.1.1 Κύτταρα

Υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί τύποι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή αυτή, στους οποίους περιλαμβάνονται υποκλώνοι των L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 ή TK6 κυττάρων. Οι κυτταρικοί τύποι που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή αυτή θα πρέπει να έχουν αποδεδειγμένη ευαισθησία σε χημικά μεταλλάζοντα, υψηλή αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης και σταθερή αυθόρμητη συχνότητα προϊόντων μετάλλαξης. Τα κύτταρα θα πρέπει να ελέγχονται για τυχόν παρουσία μυκοπλάσματος και εφόσον είναι μολυσμένα να μη χρησιμοποιούνται.

Η δοκιμή θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να έχει προκαθορισμένη ευαισθησία και ισχύ. Ο αριθμός των κυττάρων, οι καλλιέργειες και οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν αυτές τις καθορισμένες παραμέτρους (14). Ο ελάχιστος αριθμός βιώσιμων κυττάρων που επιζούν της κατεργασίας και χρησιμοποιούνται σε κάθε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να βασίζεται στη συχνότητα αυθόρμητης μετάλλαξης. Ένας γενικός κανόνας είναι να χρησιμοποιείται αριθμός κυττάρων που να είναι τουλάχιστον δεκαπλάσιος του αντιστρόφου της συχνότητας αυθόρμητης μετάλλαξης. Συνιστάται πάντως να χρησιμοποιούνται 10⁶ κύτταρα. Θα πρέπει να υπάρχει ιστορικό κατάλληλων στοιχείων για το χρησιμοποιούμενο κυτταρικό σύστημα που να αποδεικνύει τη συνεπή αποδοτικότητα της δοκιμής.

1.4.1.2 Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα μέσα καλλιέργειας και συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, θερμοκρασία, συγκέντρωση CO₂ και υγρασία). Τα θρεπτικά μέσα θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με τα συστήματα επιλογής και τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Παίζει σημαντικό ρόλο οι συνθήκες καλλιέργειας να επιλέγονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται η άριστη ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της περιόδου εκφράσεως και η ικανότητα σχηματισμού αποικιών μεταλλαγμένων και μη κυττάρων.

1.4.1.3 Προετοιμασία των καλλιεργειών

Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται από έτοιμες καλλιέργειες, ανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο και επωάζονται στους 37°C. Πριν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή αυτή, οι καλλιέργειες ενδέχεται να χρειάζεται να καθαριστούν από προϋπάρχοντα μεταλλαγμένα κύτταρα.

1.4.1.4 Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία παρουσία και απουσία κατάλληλου συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης. Το συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι ένα μεταμιτοχονδριακό κλάσμα εμπλουτισμένο με συμπράγοντα (S9) που παρασκευάζεται από ήπαρ τρωκτικών που έχει υποβληθεί σε κατεργασία με ενζυμοεπαγωγικούς παράγοντες όπως : Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) ή μίγμα φαινοβαρβιτόνης και β-ναφθοφλαβόνης (19)(20).

Το μεταμιτοχονδριακό κλάσμα χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις της τάξεως του 1-10% v/v στο τελικό μέσο δοκιμής. Η επιλογή και κατάσταση ενός συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης μπορεί να εξαρτάται από την τάξη της υπό δοκιμή χημικής ουσίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία συγκεντρώσεις μεταμιτοχονδριακού κλάσματος.

Με ορισμένες αλλαγές, στις οποίες περιλαμβάνεται και η παρασκευή επεξεργασμένων με μεθόδους γενετικής μηχανικής κυτταρικών σειρών που εκφράζουν ειδικά ενεργοποιητικά ένζυμα, ενδέχεται να γίνει και ενδογενής ενεργοποίηση. Η επιλογή των χρησιμοποιούμενων κυτταρικών σειρών πρέπει να αιτιολογείται επιστημονικώς (π.χ. από τη σχέση του κυτοχρωμικού P450 ισοενζύμου στο μεταβολισμό της υπό δοκιμή ουσίας).

1.4.1.5 *Υπό δοκιμή ουσία/Προετοιμασία*

Οι στερεές υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται εφόσον απαιτείται πριν από την κατεργασία των κυττάρων. Οι υγρές ουσίες μπορούν να προστίθενται απευθείας στα συστήματα δοκιμής και/ή να αραιώνονται πριν από την κατεργασία. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας στοιχεία επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2 **Συνθήκες δοκιμής**

1.4.2.1 *Διαλύτης/φορέας*

Δεν πρέπει να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδραση του διαλύτη/φορέα με την υπό δοκιμή ουσία ενώ θα πρέπει να είναι συμβατός με την επιβίωση των κυττάρων και τη δραστηριότητα S9. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα. Όταν εξετάζονται ουσίες που δεν είναι σταθερές στο νερό, οι χρησιμοποιούμενοι οργανικοί διαλύτες θα πρέπει να είναι απαλλαγμένοι ύδατος. Το νερό μπορεί να αφαιρεθεί με την προσθήκη μοριακού κοσκίνου.

1.4.2.2 *Συγκεντρώσεις εκθέσεως*

Μεταξύ των κριτηρίων που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν καθορίζεται η μέγιστη προς χρήση συγκέντρωση είναι η κυτταροτοξικότητα, η διαλυτότητα στο σύστημα δοκιμής και οι μεταβολές στο pH ή την οσμωμοριακότητα.

Η κυτταροτοξικότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση στο κύριο πείραμα χρησιμοποιώντας μία κατάλληλη ένδειξη της ακεραιότητας και ανάπτυξης των κυττάρων όπως η σχετική αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης (επιβίωση) ή η σχετική συνολική ανάπτυξη. Χρήσιμο μπορεί να είναι ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας και διαλυτότητας να γίνει σε ένα προκαταρκτικό πείραμα.

Για την ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τέσσερις τουλάχιστον συγκεντρώσεις. Εφόσον εμφανίζονται φαινόμενα κυτταροτοξικότητας, οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι μικρή ή και μηδενική τοξικότητα. Αυτό σημαίνει συνήθως ότι οι συγκεντρώσεις δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από ένα συντελεστή μεταξύ 2 και $\sqrt{10}$. Εφόσον η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό 10-20% (όχι όμως λιγότερο από 10%) σχετικής επιβίωσης (σχετικής αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης) ή σχετικής συνολικής ανάπτυξης. Για σχετικώς μη κυτταροτοξικές ουσίες, η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml or 0.01 M, όποια από τις τρεις είναι χαμηλότερη.

Σχετικά αδιάλυτες ουσίες θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμή μέχρι ή και πέραν του ορίου διαλυτότητάς τους υπό τις συνθήκες καλλιέργειας. Τα σχετικά με τη δυσδιαλυτότητα στοιχεία θα πρέπει να προσδιορίζονται στο τελικό μέσο κατεργασίας στο οποίο εκτίθενται τα κύτταρα. Μπορεί να είναι χρήσιμο να υπολογιστεί η διαλυτότητα στην αρχή και το πέρας της κατεργασίας καθώς η διαλυτότητα μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο σύστημα δοκιμής λόγω της παρουσίας κυττάρων, S9, ορού, κλπ. Η μέγιστη διαλυτότητα μπορεί να ανιχνευθεί με γυμνό οφθαλμό. Το ίζημα δεν πρέπει να παρεμβαίνει στα αποτελέσματα της εκτίμησης.

1.4.2.3 *Μάρτυρες*

Σε κάθε πείραμα θα πρέπει να περιλαμβάνονται και καλλιέργειες με θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες (διαλύτης ή φορέας), με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Όταν χρησιμοποιείται μεταβολική ενεργοποίηση, ως θετικός μάρτυρας θα πρέπει να χρησιμοποιείται ουσία που απαιτεί ενεργοποίηση για την παροχή μεταλλαξογόνου απόκρισης.

Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

Μεταβολική ενεργοποίηση	Γενετικός τύπος	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Απουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	HPRT	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0	200-536-7
		Αιθυλο νιτροζουρία	759-73-9	212-072-2
	TK (μικρές και μεγάλες αποικίες)	Μεθανοσουλφονικός μεθυλεστέρας	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Μεθανοσουλφονικός αιθυλεστέρας	62-50-0
Παρουσία εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης	HPRT	3-Μεθυλοχολανθρένιο	56-49-5	200-276-4
		N-Νιτροζωδιμεθυλαμίνη	62-75-9	200-549-8
		7,12-Διμεθυλοβενζανθρακένιο	57-97-6	200-359-5
	TK (μικρές και μεγάλες αποικίες)	Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0	200-015-4
		Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	6055-19-2	
		Βενζο[α]πυρένιο	50-32-8	200-028-5
		3-Μεθυλοχολανθρένιο	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-Νιτροζωδιμεθυλαμίνη (για υψηλά επίπεδα S9)	62-75-9	200-549-8
Βενζο[α]πυρένιο		50-32-8	200-028-5	

Ως θετικοί μάρτυρες αναφοράς μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες ουσίες, π.χ. εάν ένα εργαστήριο έχει ένα ιστορικό με στοιχεία για την 5-Βρωμο 2'-δεοξυουριδίνη [CAS n. 59-14-3, EINECS n. 200-415-9], μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αυτή η ουσία αναφοράς. Εφόσον υπάρχουν, θα πρέπει να εξετάζεται η χρήση ως θετικών μαρτύρων ουσιών σχετικής χημικής τάξης.

Θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, αποτελούμενοι από μόνο τον διαλύτη ή φορέα στο μέσο κατεργασίας, και κατεργασμένοι με τον ίδιο τρόπο με εκείνο των καλλιιεργειών της υπό δοκιμή ουσίας. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποστάντες επεξεργασία μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν πρότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξογόνα αποτελέσματα.

1.4.3 Διαδικασία

1.4.3.1 Κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία

Πολλαπλασιασθέντα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως τρεις έως έξι ώρες είναι αρκετό). Ο χρόνος έκθεσης μπορεί να αντιστοιχεί σε ένα ή περισσότερους κυτταρικούς κύκλους.

Για κάθε συγκέντρωση, μπορούν να χρησιμοποιηθούν απλές ή διπλές καλλιέργειες της υπό δοκιμή ουσίας. Όταν χρησιμοποιούνται απλές καλλιέργειες, ο αριθμός των συγκεντρώσεων θα πρέπει να αυξάνεται ώστε να εξασφαλίζεται ο κατάλληλος αριθμός καλλιεργειών για ανάλυση (π.χ. τουλάχιστον 8 προς ανάλυση συγκεντρώσεις). Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για αρνητικοί μάρτυρες (διαλύτης), θα πρέπει να είναι εις διπλούν.

Οι αέριες ή πτητικές ουσίες θα πρέπει να εξετάζονται με κατάλληλες μεθόδους, όπως π.χ. σε σφραγισμένα δοχεία καλλιέργειας (21)(22).

1.4.3.2 Μέτρηση επιβίωσης, βιωσιμότητας και συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης

Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, τα κύτταρα πλένονται και καλλιεργούνται για τον προσδιορισμό της επιβίωσης και για να μπορέσει να επιτευχθεί η έκφραση του φαινοτύπου των προϊόντων μετάλλαξης. Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας με τον προσδιορισμό της σχετικής αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης (επιβίωσης) ή της σχετικής συνολικής ανάπτυξης των καλλιεργειών γίνεται συνήθως μετά την περίοδο κατεργασίας.

Κάθε γενετικός τόπος έχει καθορισμένες χρονικές απαιτήσεις για να πραγματοποιηθεί η κατ' ουσία άριστη φαινοτυπική έκφραση προσφάτως παραχθέντων προϊόντων μετάλλαξης (οι HPRT και XPRT απαιτούν τουλάχιστον 6-8 ημέρες και η TK τουλάχιστον 2 ημέρες). Τα κύτταρα αυξάνονται σε θρεπτικό μέσο με και χωρίς παράγοντα ή παράγοντες επιλογής για τον προσδιορισμό του αριθμού των προϊόντων μετάλλαξης και της αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης, αντίστοιχα. Η μέτρηση της βιωσιμότητας (που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης) ξεκινά στο τέλος του χρόνου έκφρασης με επίστρωση σε μη επιλεκτικό μέσο.

Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι θετική στη δοκιμή L5178Y TK+/-, θα πρέπει να πραγματοποιείται μέτρηση μεγέθους των αποικιών σε μία τουλάχιστον από τις καλλιέργειες της δοκιμής (με την υψηλότερη θετική συγκέντρωση) καθώς και στον αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Εάν η υπό δοκιμή ουσία είναι αρνητική στη δοκιμή L5178Y TK+/-, θα πρέπει να πραγματοποιείται μέτρηση μεγέθους αποικιών στον αρνητικό και θετικό μάρτυρα. Σε δοκιμές στις οποίες χρησιμοποιείται TK6TK+/-, μπορεί επίσης να γίνει μέτρηση μεγέθους αποικιών.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στα λαμβανόμενα στοιχεία θα πρέπει να περιλαμβάνεται προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας και βιωσιμότητας, ο αριθμός των αποικιών και η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης και για τις υπό δοκιμή καλλιέργειες και για τους μάρτυρες. Σε περίπτωση θετικής αποκρίσεως στη δοκιμή L5178Y TK+/-, οι αποικίες καταμετρούνται με βάση τα κριτήρια για τις μικρές και μεγάλες αποικίες για μία τουλάχιστον συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας (μέγιστη θετική συγκέντρωση) και στον αρνητικό και τον θετικό μάρτυρα. Η μοριακή και κυτταρογενετική φύση και των μικρών και των μεγάλων αποικιών προϊόντων μετάλλαξης έχει μελετηθεί λεπτομερώς (23)(24). Στην δοκιμή TK+/-, οι αποικίες καταμετρούνται με βάση τα κριτήρια για τις αποικίες κανονικής ανάπτυξης (μεγάλες) και βραδείας ανάπτυξης (μικρές) (25). Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που έχουν υποστεί τις πλέον εκτεταμένες γενετικές βλάβες έχουν παρατεταμένο χρόνο διπλασιασμού και έτσι σχηματίζουν μικρές αποικίες. Οι βλάβες αυτές μπορούν να είναι από απώλεια ολόκληρου του γονιδίου μέχρι καρυοτυπικός ορατός χρωμοσωμικές εκτροπές. Η εμφάνιση προϊόντων μετάλλαξης σε μικρές αποικίες συνδέεται με χημικές ουσίες που προκαλούν σοβαρές χρωμοσωμικές εκτροπές (26). Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που έχουν πληγεί λιγότερο σοβαρά, αναπτύσσονται με ρυθμούς παρόμοιους με εκείνους των γονικών κυττάρων και σχηματίζουν μεγάλες αποικίες.

Θα πρέπει να δίνεται η επιβίωση (σχετική αποτελεσματικότητα κλωνοποίησης) ή η σχετική συνολική ανάπτυξη. Η συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης θα πρέπει να εκφράζεται ως ο αριθμός των μεταλλαγμένων κυττάρων προς τον αριθμό των επιβιωσάντων κυττάρων.

Θα πρέπει να δίνονται στοιχεία για κάθε μεμονωμένη καλλιέργεια. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να δίνονται με τη μορφή πίνακα.

Δεν απαιτείται επαλήθευση των σαφών θετικών αποκρίσεων. Τυχόν διαφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να αποσαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας κατά προτίμηση τις πειραματικές συνθήκες. Τα αρνητικά αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται περίπτωση προς περίπτωση. Στις περιπτώσεις όπου δεν κρίνεται αναγκαία η επιβεβαίωση των αρνητικών αποτελεσμάτων, θα πρέπει να παρέχεται σχετική αιτιολόγηση. Στις επιβεβαιωτικά πειράματα, τόσο για τα διαφορούμενα όσο και για τα αρνητικά αποτελέσματα, θα πρέπει να εξετάζεται η τροποποίηση των παραμέτρων της μελέτης ώστε να καλύπτονται όλη την έκταση των εκτιμώμενων συνθηκών. Στις παραμέτρους που μπορούν να τροποποιηθούν περιλαμβάνεται το εύρος των συγκεντρώσεων και οι συνθήκες μεταβολικής ενεργοποίησης.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό εφαρμόζονται διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με την συγκέντρωση αύξηση ή η αναπαραγωγή αύξηση στη συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι. Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξογόνος στο σύστημα αυτό.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστηριότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διαφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vitro* δοκιμή κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης σε θηλαστικά δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις στα χρησιμοποιηθέντα και καλλιεργηθέντα κύτταρα θηλαστικού. Η περίπτωση με τη μεγαλύτερη σημαντικότητα είναι εκείνη όπου υπάρχει θετική και αναπαραγωγή συνάρτηση απόκρισης με συγκέντρωση. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει γονιδιακές μεταλλάξεις στα χρησιμοποιηθέντα και καλλιεργηθέντα κύτταρα θηλαστικού.

3.

ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/Φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα/διαλύτη,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέας, εφόσον είναι γνωστές,

Κύτταρα:

- τύπο και πηγή των κυττάρων,
- αριθμό των κυτταρικών καλλιιεργειών,
- αριθμό κυτταρικών διελεύσεων, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μεθόδους συντήρησης της κυτταρικής καλλιέργειας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- απουσία μυκοπλάσματος, εφόσον συντρέχει περίπτωση

Συνθήκες δοκιμής:

- αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού των καλλιιεργειών συμπεριλαμβανομένων, π.χ. στοιχείων κυτταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εφόσον συντρέχει περίπτωση
- σύσταση του μέσου καλλιέργειας, συγκέντρωση CO₂,
- συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,
- όγκο του φορέα και της προστιθέμενης υπό δοκιμή ουσίας,
- θερμοκρασία επώασης,
- χρόνο επώασης,
- διάρκεια της κατεργασίας,
- πυκνότητα των κυττάρων κατά την κατεργασία,
- τύπο και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και κριτηρίων αποδοχής,
- θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες,
- διάρκεια της περιόδου έκφρασης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανακαλλιιεργηθέντων κυττάρων και των υποκαλλιιεργειών και διαγραμμάτων διατροφής, εφόσον συντρέχει περίπτωση),
- παράγοντες επιλογής,
- κριτήρια για την κατάταξη μιας δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.
- μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του αριθμού των βιώσιμων και των μεταλλαγμένων κυττάρων,
- ορισμό των αποικιών σχετικά με το μέγεθος και τον τύπο τους (συμπεριλαμβανομένων των κριτηρίων κατάταξης σε “μικρές” και “μεγάλες” αποικίες, εφόσον συντρέχει περίπτωση).

Αποτελέσματα:

- σημάδια τοξικότητας,
- σημάδια καθίζησης,
- στοιχεία για το pH και την οσμωμοριακότητα κατά τη διάρκεια της έκθεσης στην υπό δοκιμή ουσία, εφόσον προσδιορίστηκαν,
- μέγεθος των αποικιών, εφόσον καταγράφηκε, τουλάχιστον για τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες,
- επάρκεια του εργαστηρίου στην ανίχνευση μικροαποικιακών προϊόντων μετάλλαξης με το σύστημα L5178Y TK^{+/+}, όπου συντρέχει περίπτωση,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,
- στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,
- παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,
- προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,
- συχνότητα των προϊόντων μετάλλαξης

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
2. Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.
3. Liber, H.L. and 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. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. *Mutagenesis*, 4, 394-403.
5. Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121-128.
6. Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235-239.
7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147-204.
8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavourin, 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. and Wasson, J.S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17-36.
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. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. *Mutation Res.*, 189, 135-141.
11. Liber, H.L., Yandell, D.W and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9-17.
12. Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate - and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133-147.
13. Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK+/- - TK+/- Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
14. Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.

15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365-373.

16. 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.
17. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61-108.
18. Maron, D.M. and 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. and 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. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
21. 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.
22. 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.
23. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. 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. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161-174.
25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. and 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. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK+/- -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609-614.

B. 18

ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ DNA — ΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΤΗ ΣΥΝΘΕΣΗ DNA — ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ — IN VITRO

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος B.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος B.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμασία απρογραμματίστης σύνθεσης DNA (UDS) μετρά την επανόρθωση της σύνθεσης του DNA μετά την εκτομή και αφαίρεση τμήματος του DNA που περιέχουν την περιοχή της βλάβης, η οποία προκαλείται από χημικούς και φυσικούς παράγοντες. Η δοκιμασία βασίζεται στην εισαγωγή τριτομιώνης θυμιδίνης ($^3\text{H-TdR}$) στο DNA κυττάρων θηλαστικών, τα οποία δεν βρίσκονται στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η λήψη της $^3\text{H-TdR}$ μπορεί να προσδιοριστεί με αυτοραδιογραφία ή με μέτρηση υγρού σπινθηρισμού (LSC) σε DNA από κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή. Εφόσον δεν χρησιμοποιούνται αρχέτυπα ηπατοκύτταρα ποντικών, τα κύτταρα θηλαστικών μέσα στην καλλιέργεια υφίστανται αγωγή με την δοκιμαζόμενη ουσία με ή χωρίς εξωγενή μεταβολική ενεργοποίηση. Η UDS μπορεί επίσης να μετρηθεί σε συστήματα in vivo.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες και οι μάρτυρες ελέγχου ή οι ουσίες αναφοράς πρέπει να προστεθούν σε θρεπτικό μέσον ανάπτυξης ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλο φορέα και έπειτα να διαλυθούν σε θρεπτικό μέσον ανάπτυξης για να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία. Η τελική συγκέντρωση του φορέα δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Καλλιέργειες αρχέτυπων ηπατοκυττάρων ποντικών, ανθρώπινων λεμφοκυττάρων ή καθορισμένες σειρές κυττάρων (π.χ. ανθρώπινοι διπλοειδείς ινοβλάστες) μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία.

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στην πειραματική ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Συνθήκες δοκιμασίας

Αριθμός καλλιεργειών

Δύο τουλάχιστον καλλιέργειες κυττάρων για την αυτοραδιογραφία και έξι καλλιέργειες κυττάρων με LSC προσδιορισμούς UDS (ή λιγότερες, εάν επιστημονικά κρίνεται σκόπιμο) είναι απαραίτητες για κάθε πείραμα.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων με μάρτυρες

Πρέπει να γίνονται συγχρόνως με κάθε πείραμα θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι (χωρίς αγωγή ή/και φορέα) με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση.

Παράδειγμα θετικών ελέγχων με μάρτυρες για τη δοκιμασία ηπατοκυττάρων αρουραίου είναι το 7,12-DMBA (7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο) ή το 2-AAF (2-ακετυλαμινοφλουορένιο). Στην περίπτωση καθορισμένων σειρών κυττάρων το 4-NQO (οξείδιο-N της 4-νιτροκινολίνης) είναι ένα παράδειγμα θετικού ελέγχου τόσο για αυτοραδιογραφικά πειράματα όσο και για πειράματα με LSC, που εκτελούνται χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Η N-νιτροζοδιμεθυλαμίνη αποτελεί παράδειγμα ουσίας θετικού ελέγχου, όταν χρησιμοποιούνται συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται πολλές συγκεντρώσεις της πειραματικής ουσίας επαρκείς για τον προσδιορισμό της ανταπόκρισης. Η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να προκαλεί μερικές κυτταροτοξικές επιδράσεις. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ενώσεις πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους. Για πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές χημικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της πειραματικής χημικής ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Κύτταρα

Πρέπει να χρησιμοποιούνται προσφύες μέσον ανάπτυξης, κατάλληλη συγκέντρωση σε CO₂ καθώς και κατάλληλη θερμοκρασία και υγρασία για τη συντήρηση των καλλιέργειών. Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων πρέπει να ελέγχονται περιοδικά για πρόσμεξη μυκοπλάσματος.

Επίσης είναι επιθυμητός ο περιοδικός έλεγχος των κυττάρων για σταθερότητα καρυότυπου.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Δεν χρησιμοποιείται σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης σε καλλιέργειες αρχετύπων ηπατοκυττάρων. Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων και τα λεμφοκύτταρα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

Διαδικασία

Παρασκευή καλλιέργειών

Οι καθορισμένες σειρές κυττάρων παράγονται από μόνιμες καλλιέργειες (π.χ. με θρυψινοποίηση ή με αποτίναξη), εμφυτεύονται σε δοχεία καλλιέργειας με κατάλληλη πυκνότητα και επωάζονται σε 37 °C.

Δημιουργούνται βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ηπατοκυττάρων αρουραίων, επιτρέποντας στα πρόσφατα αποσυνοδευμένα ηπατοκύτταρα σε προσφύες μέσον να προσκολληθούν στην αναπτυσσόμενη επιφάνεια.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων γίνονται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων τεχνικών μεθόδων.

Κατεργασία των καλλιέργειών με τη δοκιμαζόμενη ουσία

Αρχέτυπα ηπατοκύτταρα αρουραίου: Πρόσφατα απομονωμένα ηπατοκύτταρα αρουραίου υφίστανται κατεργασία με την δοκιμαζόμενη ουσία σε μέσον που περιέχει ³H-TdR, για κατάλληλη χρονική περίοδο. Στο τέλος της περιόδου αγωγής τα κύτταρα πρέπει να αποσυρθούν από το μέσον, να εκπλυθούν, να μονιμοποιηθούν, και να στεγνώσουν.

Οι αντικειμενοφόροι πρέπει να εμβαπτισθούν σε αυτοραδιογραφικό γαλάκτωμα, να μείνουν σε 4 °C για κατάλληλο χρονικό διάστημα, να εμφανιστούν, να χρωσθούν και να γίνουν οι μετρήσεις.

Καθορισμένες σειρές κυττάρων και λεμφοκύτταρα

Τεχνικές αυτοραδιογραφίας: Οι καλλιέργειες κυττάρων εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία για κατάλληλο χρονικό διάστημα και έπειτα υφίστανται αγωγή με ³H-TdR. Ο χρόνος καθορίζεται από τη φύση της ουσίας, τη δραστηριότητα του συστήματος μεταβολισμού και τον τύπο των κυττάρων. Για την ανίχνευση της μέγιστης UDS, πρέπει να προστεθεί ³H-TdR είτε ταυτόχρονα με την δοκιμαζόμενη ουσία είτε λίγα λεπτά μετά την έκθεση στην δοκιμαζόμενη ουσία.

Η επιλογή μεταξύ των δύο αυτών διαδικασιών επηρεάζεται από πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της δοκιμαζόμενης ουσίας και του ³H-TdR.

Για να γίνει η διάκριση μεταξύ της UDS και του ημισυντηρητικού αναδιπλασιασμού του DNA, ο τελευταίος μπορεί να ανασταλεί, π.χ., με τη χρήση υλικού από το οποίο λείπει η αργινίνη, με χαμηλή περκεπτικότητα ορού ή με παρουσία υδροξυουρίας στο υλικό της καλλιέργειας.

Μετρήσεις της UDS με LSC: Πριν από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία, η είσοδος των κυττάρων στη φάση S πρέπει να εμποδιστεί, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Τα κύτταρα πρέπει να εκτεθούν στην πειραματική χημική ουσία όπως περιγράφεται για την αυτοραδιογραφία. Στο τέλος της περιόδου επώασης, το DNA πρέπει να αποσπαστεί από τα κύτταρα και να καθοριστεί το συνολικό περιεχόμενο DNA και η έκταση της ενσωμάτωσης του ³H-TdR.

Πρέπει να σημειωθεί ότι όπου, στις παραπάνω τεχνικές, χρησιμοποιούνται ανθρώπινα λεμφοκύτταρα η αναστολή του ημισυντηρητικού αναδιπλασιασμού του DNA δεν είναι αναγκαία σε μη διεγερμένες καλλιέργειες.

Ανάλυση

Αυτοραδιογραφικοί προσδιορισμοί

Για τον προσδιορισμό της UDS σε κύτταρα που βρίσκονται μέσα σε καλλιέργεια, οι πυρήνες της φάσης S, δεν καταμετρώνται. 50 τουλάχιστον κύτταρα ανά συγκέντρωση πρέπει να μετρηθούν. Οι πλάκες πρέπει να κωδικοποιηθούν πριν καταμετρηθούν. Σε κάθε πλάκα πρέπει να καταμετρηθούν διάφορα ευρέως διαχωρισμένα τυχαία πεδία. Η ποσότητα της ενσωμάτωσης $^3\text{H-TdR}$ στο κυτταρόπλασμα πρέπει να προσδιοριστεί με την καταμέτρηση τριών περιοχών μεγέθους πυρήνα μέσα στο κυτταρόπλασμα κάθε καταμετρηθέντος κυττάρου.

Προσδιορισμοί με LSC

Πρέπει να χρησιμοποιηθεί επαρκής αριθμός καλλιεργιών για κάθε συγκέντρωση και για κάθε μάρτυρα για τον προσδιορισμό της UDS με LSC.

Όλα τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα παρουσιάζονται με τη μορφή πίνακα.

2.1. Αυτοραδιογραφικοί προσδιορισμοί

Η έκταση της ενσωμάτωσης του $^3\text{H-TdR}$ στο κυτταρόπλασμα και ο αριθμός των κόκκων που βρέθηκαν πάνω στον πυρήνα του κυττάρου πρέπει να καταγραφούν χωριστά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέσες και επικρατούσες (mode) τιμές για την περιγραφή της κατανομής της έκτασης της ενσωμάτωσης του $^3\text{H-TdR}$ στο κυτταρόπλασμα και του αριθμού των κόκκων ανά πυρήνα.

2.2. Προσδιορισμοί με LSC

Στους προσδιορισμούς με LSC, η ενσωμάτωση της $^3\text{H-TdR}$ θα πρέπει να αναφέρεται σαν dpm/μg DNA.

Η μέση τιμή dpm/μg DNA με την μέση σταθερή απόκλιση μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγραφεί η κατανομή της ενσωμάτωσης.

Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμώνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, πυκνότητα και αριθμός διελεύσεων κατά το χρόνο αγωγής, αριθμός καλλιεργιών κυττάρων,
- μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη συντήρηση των καλλιεργιών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του θρεπτικού μέσου, της θερμοκρασίας και της συγκέντρωσης σε CO_2 ,
- δοκιμαζόμενη ουσία, φορέας, συγκεντρώσεις και αιτιολόγηση για την επιλογή των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δοκιμασία,
- στοιχεία για τα συστήματα μεταβολικής ενεργοποίησης,
- πρόγραμμα αγωγής,
- θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι,

- αυτοραδιογραφική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε,
- διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρεμπόδιση της εισόδου των κυττάρων στη φάση S,
- διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν για την απόσπαση του DNA και για τον προσδιορισμό του συνολικού περιεχομένου DNA σε μετρήσεις LSC,
- σχέση δόσης/αποτελέσματος, όπου είναι δυνατόν,
- στατιστική εκτίμηση,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 19

ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΔΕΛΦΩΝ ΧΡΩΜΑΤΙΔΩΝ IN VITRO

1. **ΜΕΘΟΔΟΣ**
- 1.1. **Εισαγωγή**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.
- 1.2. **Ορισμοί**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.
- 1.3. **Ουσίες αναφοράς**

Καμία.
- 1.4. **Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας**

Η μέθοδος ανταλλαγής αδελφών χρωματίδων (SCE) αποτελεί μια γρήγορη δοκιμασία για την ανίχνευση των ανταλλαγών του DNA μεταξύ δύο αδελφών χρωματίδων ενός διπλοποιημένου χρωμοσώματος. Η μέθοδος αυτή αντιπροσωπεύει την ανταλλαγή προϊόντων αναδιπλασιασμού του DNA σε φαινομενικά ομόλογες θέσεις. Η διαδικασία ανταλλαγής αφορά προφανώς θραύση του DNA και επανέωση, παρ' όλο ότι λίγα είναι γνωστά για τη μοριακή βάση. Η ανίχνευση των SCE απαιτεί τη δυνατότητα διαφορετικής σήμανσης αδελφών χρωματίδων, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με ενσωμάτωση βρωμοδεσοξυουριδίνης (BrdU) μέσα σε χρωμοσωμικό DNA για ένα ή δύο κυτταρικούς κύκλους.

Τα κύτταρα θηλαστικών in vitro εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία, με ή χωρίς σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης θηλαστικού, εάν χρειάζεται, και καλλιεργούνται για δύο κύκλους αναδιπλασιασμού σε υλικό το οποίο περιέχει BrdU.

Μετά από αγωγή με αναστολέα ατράκτου (π.χ. κολχικίνη) ώστε να μαζευτούν κύτταρα σε μία μεταφασική φάση μίτωσης (μετάφαση C), τα κύτταρα συλλέγονται και γίνονται παρασκευάσματα χρωμοσωμάτων.
- 1.5. **Κριτήρια ποιότητας**

Κανένα.
- 1.6. **Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας**

Προετοιμασία

 - Στη δοκιμασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρχέτυπες καλλιέργειες (ανθρώπινα λεμφοκύτταρα), ή καθορισμένες σειρές κυττάρων [κ.χ. κύτταρα ωθηκών κινέζικου κρικτηού (chinese hamster)]. Οι σειρές κυττάρων πρέπει να ελέγχονται για πρόσμιξη μυκοπλάσματος.
 - Πρέπει να χρησιμοποιηθούν προσφύες μέσον καλλιέργειας και κατάλληλες συνθήκες επώασης (π.χ. θερμοκρασία, δοχεία καλλιέργειας, συγκέντρωση σε CO₂ και υγρασία).
 - Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστεθούν σε μέσον καλλιέργειας ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλους φορείς πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση ενός φορέα στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων ή το ρυθμό ανάπτυξης και οι επιδράσεις στη συχνότητα των SCE πρέπει να παρακολουθούνται με έλεγχο διαλύτου.
 - Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς σύστημα εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης θηλαστικού. Εναλλακτικά, όπου χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι με εγγενή μεταβολική δραστηριότητα, ο ρυθμός και η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι κατάλληλα για τη χημική κατηγορία που δοκιμάζεται.

Συνθήκες δοκιμασίας

Αριθμός καλλιεργειών

Διπλές τουλάχιστον καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για κάθε πειραματική μέτρηση.

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων με μάρτυρες

Πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε πείραμα θετικοί έλεγχοι με τη χρήση τόσο μιας ουσίας άμεσης ενέργειας όσο και μιας ουσίας που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Πρέπει επίσης να γίνεται έλεγχος του φορέα.

Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί έλεγχοι:

- ουσία άμεσης ενέργειας:
 - αιθυλοσουλφονικό μεθόλιο
- ουσία έμμεσης ενέργειας:
 - κυκλοφωσφαμίδιο.

Όπου είναι δυνατόν μπορεί να γίνεται και πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας όπως η χημική ουσία της δοκιμασίας.

Συγκέντρωση έκθεσης

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον κατάλληλα κατανεμημένες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Η υψηλότερη συγκέντρωση μπορεί να προκαλεί σημαντικές τοξικές επιδράσεις, αλλά πρέπει παρ' όλα αυτά να επιτρέπεται επαρκή κυτταρικό αναδιπλασιασμό. Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για πολύ υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Διαδικασία

Παρασκευή καλλιέργειών

Καθορισμένες σειρές κυττάρων δημιουργούνται από βασικές καλλιέργειες (π.χ. με θρυψινοποίηση ή με αποτίναξη), εμφυτεύονται σε δοχεία καλλιέργειας με κατάλληλη πυκνότητα και επωάζονται σε 37 °C. Για μονοστρωματικές καλλιέργειες, ο αριθμός κυττάρων ανά δοχείο καλλιέργειας πρέπει να ρυθμίζεται έτσι ώστε οι καλλιέργειες να μην είναι συνενομένες περισσότερο από 50% κατά το χρόνο της συλλογής. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε καλλιέργεια εναιωρήματος.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων γίνονται από ηπαρινισμένο αίμα με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών μεθόδων και επωάζονται σε 37 °C.

Αγωγή

Τα κύτταρα σε εκθετική φάση ανάπτυξης εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία για κατάλληλη χρονική περίοδο (στις περισσότερες μία έως δύο ώρες είναι αρκετές), αλλά ο χρόνος αγωγής μπορεί να επεκταθεί μέχρι δύο πλήρεις κυτταρικούς κύκλους, σε ορισμένες περιπτώσεις. Κύτταρα χωρίς επαρκή εγγενή μεταβολική δραστηριότητα πρέπει να εκτίθενται στην δοκιμαζόμενη χημική ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Κατά το τέλος της περιόδου της έκθεσης, τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η δοκιμαζόμενη ουσία και καλλιεργούνται για δύο κύκλους αναδιπλασιασμού με παρουσία BrdU. Σαν εναλλακτική διαδικασία, τα κύτταρα μπορούν να εκτεθούν ταυτόχρονα στην δοκιμαζόμενη χημική ουσία και στο BrdU για ολόκληρο το χρόνο καλλιέργειας δύο κυτταρικών κύκλων.

Οι καλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων υφίστανται αγωγή ενώ βρίσκονται σε ημισύγχρονη κατάσταση.

Τα κύτταρα αναλύονται κατά τη δεύτερη διαίρεσή τους μετά την αγωγή, εξασφαλίζοντας ότι οι πιο ευαίσθητες φάσεις του κυτταρικού κύκλου έχουν εκτεθεί στη δοκιμαζόμενη ουσία. Όλες οι καλλιέργειες στις οποίες προστίθεται το BrdU πρέπει να βρίσκονται σε σκότος ή σε ημίφως, που παράγεται με λάμπες πυράκτωσης, μέχρι το χρόνο συλλογής των κυττάρων, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί η φωτόλυση του DNA που περιέχει BrdU.

Συλλογή των κυττάρων

Οι καλλιέργειες κυττάρων υφίστανται αγωγή με αναστολέα ατράκτου (π.χ. κολχικίνη) μία έως τέσσερις ώρες πριν από τη συλλογή. Κάθε καλλιέργεια συλλέγεται και υφίσταται επεξεργασία χωριστά για την παρασκευή χρωμοσωμάτων.

Ετοιμασία χρωμοσωμάτων και χρώση

Η ετοιμασία χρωμοσωμάτων γίνεται με πρότυπες κυτταρογενετικές τεχνικές. Η χρώση των πλακών για να φανούν οι SCE μπορεί να εκτελεσθεί με διάφορες τεχνικές (π.χ. μέθοδος φθορισμού και Giemsa).

Ανάλυση

Ο αριθμός των αναλυόμενων κυττάρων πρέπει να βασίζεται στη συχνότητα αυτογενούς ελέγχου των SCE. Συνήθως, 25 τουλάχιστον καλά διασπαρμένες μεταφάσεις ανά καλλιέργεια αναλύονται για τις SCE. Οι πλάκες κωδικοποιούνται πριν από την ανάλυση. Στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα αναλύονται μόνο μεταφάσεις που περιέχουν 46 κεντρομερίδια.

Σε καθορισμένες σειρές κυττάρων αναλύονται μόνο μεταφάσεις που περιέχουν κεντρομερίδια ± 2 του κανονικού αριθμού. Πρέπει να αναφέρεται εάν η κεντρομερική μεταβολή της σημασιότητας καταγράφεται σαν SCE. Τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα.

Ο αριθμός των SCE για κάθε μετάφαση και ο αριθμός των SCE ανά χρωμόσωμα για κάθε μετάφαση πρέπει να καταγράφονται χωριστά για όλες τις καλλιέργειες που υφίστανται την αγωγή και για τις καλλιέργειες του μάρτυρα.

Τα δεδομένα πρέπει να εκτιμώνται με τη χρήση κατάλληλων στατιστικών μεθόδων.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, μέθοδοι συντήρησης της καλλιέργειας κυττάρων,
- συνθήκες του πειράματος: σύνθεση των υλικών, συγκέντρωση σε CO₂, συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας, έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε, θερμοκρασία επώασης, χρόνος αγωγής, αναστολέας ατράκτου που χρησιμοποιήθηκε, συγκέντρωσή του και διάρκεια αγωγής με αυτόν, τύπος συστήματος ενεργοποίησης θηλαστικού που χρησιμοποιήθηκε, θετικές και αρνητικές δοκιμασίες (μάρτυρες),
- αριθμός καλλιεργείων κυττάρων ανά δοκιμασία,
- λεπτομέρειες της τεχνικής που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των τριβλίων,
- αριθμός των μεταφάσεων που αναλύθηκαν (στοιχεία χωριστά για κάθε καλλιέργεια),
- μέσος αριθμός SCE ανά μετάφαση και ανά χρωμόσωμα,
- κριτήρια για την καταγραφή των SCE,
- αιτιολόγηση της επιλογής της δόσης,
- σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν είναι δυνατόν,
- στατιστική αξιολόγηση,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 20

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΟΥ ΥΠΟΔΕΙΠΟΜΕΝΟΥ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ DROSOPHILA MELANOGASTER

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμίας

Η δοκιμασία αυτή (SLRL) με τη χρήση της *Drosophila melanogaster* ανιχνεύει την εμφάνιση μεταλλάξεων σημείου καθώς και μικρών αφαιρέσεων στη σειρά γεννητικών κυττάρων του εντόμου. Η δοκιμασία αυτή αποτελεί δοκιμή πρόσω μεταλλάξης για την εξέταση μεταλλάξεων 800 περίπου θέσεων επί του χρωμοσώματος X, που αντιπροσωπεύει το 80% περίπου όλων των X-χρωμοσωμικών θέσεων. Το χρωμόσωμα X αντιπροσωπεύει περίπου το ένα πέμπτο ολόκληρου του απλοειδούς γονοτύπου.

Οι μεταλλάξεις στο X-χρωμόσωμα της *Drosophila melanogaster* εκφράζονται φαινοτυπικά σε αρσενικά που φέρουν το μεταλλαγμένο γονίδιο. Όταν η μετάλλαξη είναι θανατηφόρα στην ημίζυγη κατάσταση, η παρουσία της συμπεραίνεται από την απουσία μιας συνομοταξίας αρσενικών απογόνων από τις δύο που παράγονται κανονικά από μια ετερόζυγη θηλυκή. Η δοκιμασία SLRL επωφελείται των γεγονότων αυτών με τη χρήση ειδικά σημειωμένων και τακτοποιημένων χρωμοσωμάτων.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμίας

Προετοιμασία

Βασικές καλλιέργειες

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα αρσενικά μιας καλά καθορισμένης καλλιέργειας φυσικού τύπου και τα θηλυκά της βασικής καλλιέργειας Muller-5. Άλλες κατάλληλα σημειωμένες θηλυκές βασικές καλλιέργειες με πολλαπλά ανεστραμένα X-χρωμοσώματα μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν.

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες πρέπει να διαλύονται στο νερό. Οι ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό μπορούν να διαλυθούν ή να εναωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα (π.χ. μείγμα αιθανόλης και Tween-60 ή 80), έπειτα να αραιωθούν με νερό ή διάλυμα χλωριούχου νατρίου πριν τη χορήγηση. Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) πρέπει να αποφεύγεται σαν έκδοχο.

Αριθμός ζώων

Η δοκιμασία πρέπει να σχεδιαστεί με προκαθαρισμένη ευαισθησία και ισχύ. Η παρατηρούμενη συχνότητα αυτόματης μετάλλαξης στον κατάλληλο μάρτυρα θα επηρεάσει σοβαρά τον αριθμό των χρωμοσωμάτων που πρέπει να αναλυθούν.

Οδός χορήγησης

Η έκθεση μπορεί να είναι από το στόμα, με ένεση ή με έκθεση σε αέρια ή ατμούς. Η χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας μπορεί να διενεργηθεί σε ασκχαροδιάλυμα. Όπου είναι αναγκαίο, οι ουσίες μπορεί να διαλυθούν σε διάλυμα NaCl 0,7% και να εισαχθούν με ένεση στο θώρακα ή στην κοιλιά.

Χρήση αρνητικών και θετικών δοκιμασιών με μάρτυρες

Θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται αρνητικές δοκιμασίες (με έκδοχα) καθώς και θετικές. Ωστόσο, εάν υπάρχουν ιστορικά εργαστηριακά δεδομένα ελέγχου, δεν χρειάζονται σύγχρονες δοκιμασίες με μάρτυρες.

Επίπεδο έκθεσης

Τρία επίπεδα έκθεσης θεωρούνται απαραίτητα. Για μια αρχική εκτίμηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα επίπεδο έκθεσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, το οποίο μπορεί να είναι είτε η ανώτατη ανεκτή συγκέντρωση είτε εκείνη που παράγει κάποια ένδειξη τοξικότητας. Για τις μη τοξικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθεί η έκθεση στην ανώτατη δυνατή συγκέντρωση.

Διαδικασία

Τα αρσενικά φυσικού (wild) τύπου (ηλικίας τριών έως πέντε ημερών) υφίστανται αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία και ζευγαρώνονται χωριστά με πλεόνασμα παρθένων θηλυκών της βασικής καλλιέργειας Muller-5 ή από άλλη κατάλληλη σημασμένη βασική καλλιέργεια (με πολλαπλά ανεστραμμένα Χ-χρωμοσώματα). Τα θηλυκά αντικαθίστανται με καινούργια παρθένα θηλυκά κάθε δύο ως τρεις ημέρες για την κάλυψη ολοκλήρου του κύκλου του γεννητικού κυττάρου. Οι απόγονοι των θηλυκών αυτών καταγράφονται για θανατηφόρες επιδράσεις σε σχέση με τις επιδράσεις στο ώριμο σπέρμα, στα σπερματίδια μέσης ή τελευταίας φάσης, στα πρόωγα σπερματίδια, στα σπερματοκύτταρα και στα σπερματοζώγια, κατά τη διάρκεια αγωγής.

Τα ετερόζυγα θηλυκά F_1 των παραπάνω διασταυρώσεων επιτρέπεται να ζευγαρώσουν χωριστά (π.χ. ένα θηλυκό ανά φιαλίδιο) με τους αδελφούς τους. Στη γενιά F_2 , σε κάθε καλλιέργεια καταγράφεται η απουσία αρσενικών φυσικού (wild) τύπου. Εάν μια καλλιέργεια εμφανίζεται να έχει προκύψει από ένα θηλυκό F_1 που έχει ένα θανατογόνο γονίδιο στο μητρικό Χ-χρωμόσωμα (π.χ. δεν παρατηρούνται καθόλου αρσενικά με το υφιστάμενο αγωγή χρωμόσωμα), οι θυγατέρες του θηλυκού αυτού με τον ίδιο γονότυπο θα πρέπει να εξετασθούν για να διαπιστωθεί εάν η θνησιμότητα επαναλαμβάνεται στην επόμενη γενιά.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα που να δείχνει τον αριθμό των Χ-χρωμοσωμάτων που εξετάστηκαν, τον αριθμό των μη γόνιμων αρσενικών και τον αριθμό των θανατογόνων χρωμοσωμάτων σε κάθε συγκέντρωση έκθεσης και για κάθε περίοδο ζευγαρώματος, για κάθε αρσενικό που υπέστη αγωγή. Οι αριθμοί συσσωματωμάτων διαφορετικών μεγεθών ανά αρσενικό πρέπει να αναφέρονται. Τα αποτελέσματα πρέπει να επιβεβαιώνονται με χωριστό πείραμα.

Για την αξιολόγηση των δοκιμασιών του τύπου αυτού πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι. Η συσσωμάτωση (clustering) των θανατογόνων γονιδίων που προέρχονται από ένα αρσενικό πρέπει να εξετάζεται και να αξιολογείται με κατάλληλο στατιστικό τρόπο.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- βασική καλλιέργεια: βασικές καλλιέργειες *Drosophila* ή στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, ηλικία των εντόμων, αριθμός των αρσενικών που δέχθηκαν αγωγή, αριθμός στείρων αρσενικών, αριθμός καθορισμένων καλλιεργών F_2 , αριθμός καλλιεργών F_2 χωρίς απογόνους, αριθμός χρωμοσωμάτων που φέρουν θανατογόνο γονίδιο που διαπιστώθηκε σε κάθε φάση του γαμετογόνου κυττάρου,
- κριτήρια για τον καθορισμό του μεγέθους των ομάδων που υπέστησαν αγωγή,
- συνθήκες της δοκιμασίας: λεπτομερής περιγραφή του προγράμματος αγωγής και δειγματοληψίας, επίπεδα έκθεσης, δεδομένα τοξικότητας, αρνητικοί έλεγχοι (διαλύτες) με μάρτυρες και θετικοί έλεγχοι, εάν υπάρχουν,
- κριτήρια για την καταγραφή των θανατηφόρων μεταλλάξεων,
- σχέση έκθεσης/αποτελέσματος, όπου είναι δυνατόν,
- αξιολόγηση των δεδομένων,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 21

ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VITRO

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Συστήματα καλλιέργειας κυττάρων θηλαστικών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση φαινοτυπικών μεταβολών in vitro που προκαλούνται από χημικές ουσίες που σχετίζονται με κακοήγη μετασχηματισμό in vivo. Ευρύτερα χρησιμοποιούμενα κύτταρα είναι τα C3H10T $\frac{1}{2}$, 3T3, SHE, αρουραίου Fisher και τα πειράματα βασίζονται στις μεταβολές της μορφολογίας των κυττάρων, στο σχηματισμό εστιών ή στις μεταβολές στην εξάρτηση στήριξης σε ημιστέρεη ή μορφολογικές μεταβολές στα κύτταρα μετά από έκθεση σε καρκινογόνες χημικές ουσίες. Κανένα από τα τελικά σημεία του πειράματος in vitro δεν έχει αποδειγμένη μηχανιστική σχέση με τον καρκίνο. Μερικά από τα πειραματικά συστήματα μπορούν να ανιχνεύουν προαγωγείς όγκων. Η κυτταροτοξικότητα μπορεί να καθοριστεί με τη μέτρηση της επίδρασης του υλικού της δοκιμασίας σε αποικία η οποία διαμορφώνει ικανότητες (κλωνική επάρκεια) ή ρυθμούς ανάπτυξης των καλλιεργειών. Η μέτρηση της κυτταροτοξικότητας γίνεται για να αποδειχθεί ότι η έκθεση στη δοκιμαζόμενη χημική ουσία ήταν τοξικολογικά σχετική αλλά ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συχνότητας μετασχηματισμού σε όλες τις δοκιμασίες λόγω του ότι μερικές μπορούν να αφορούν μακρόχρονη επώαση ή/και ανακαλλιέργεια σε τριβλίο.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Κύτταρα

Υπάρχει μια ποικιλία σειρών κυττάρων ή αρχέτυπων κυττάρων, ανάλογα με την εκτελούμενη δοκιμασία μετασχηματισμού. Ο ερευνητής πρέπει να βεβαιωθεί ότι τα κύτταρα στην εκτελούμενη δοκιμασία παρουσιάζουν την κατάλληλη φαινοτυπική μεταβολή μετά από έκθεση σε γνωστά καρκινογόνα και ότι η δοκιμασία, στο εργαστήριο του, είναι αποδειγμένης και τεκμηριωμένης αξίας και αξιοπιστίας.

Μέσον καλλιέργειας

Πρέπει να χρησιμοποιούνται προσφύες μέσον και κατάλληλες πειραματικές συνθήκες για την εκτέλεση της δοκιμασίας μετασχηματισμού.

Δοκιμαζόμενη ουσία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες μπορούν να προστεθούν σε υλικά καλλιέργειας ή να διαλυθούν ή να εναωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα πριν από την αγωγή των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση του εκδόχου στο σύστημα καλλιέργειας δεν πρέπει να επηρεάζει τη βιωσιμότητα του κυττάρου ή το ρυθμό ανάπτυξης ή τη συχνότητα εμφάνισης μετασχηματισμών.

Μεταβολική ενεργοποίηση

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία τόσο με όσο και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Εναλλακτικά, όταν χρησιμοποιούνται κυτταρικοί τύποι, οι οποίοι διαθέτουν εγγενή μεταβολική δραστηριότητα, η φύση της δραστηριότητας πρέπει να είναι γνωστό ότι είναι κατάλληλη στη δοκιμαζόμενη χημική κατηγορία.

Συνθήκες δοκιμασίας

Χρήση θετικών και αρνητικών ελέγχων (μάρτυρες)

Σε κάθε πείραμα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και θετικοί έλεγχοι, με τη χρήση μιας ένωσης άμεσης ενέργειας και μιας ένωσης που απαιτεί μεταβολική ενεργοποίηση. Πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται ένας αρνητικός έλεγχος (με έκδοχο).

Τα παρακάτω είναι παραδείγματα ουσιών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν θετικοί μάρτυρες:

- χημικές ουσίες άμεσης ενέργειας:
 - αιθυλοσουλφονικό μεθύλιο,
 - β-προπιολακτόνη
- ενώσεις που απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση:
 - 2-ακετυλαμινοφλουορένιο,
 - 4-διμεθυλαμινοβενζόλιο,
 - 7,12-διμεθυλοβενζανθρακένιο.

Όπου χρειάζεται, πρέπει να συμπεριλαμβάνεται ένας πρόσθετος θετικός έλεγχος με ουσία της ίδιας χημικής κατηγορίας όπου ανήκει η δοκιμαζόμενη ένωση.

Συγκεντρώσεις έκθεσης

Χρησιμοποιούνται διάφορες συγκεντρώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας. Οι συγκεντρώσεις αυτές πρέπει να δημιουργούν μια τοξική επίδραση ανάλογη με τη συγκέντρωση, και η υψηλότερη συγκέντρωση πρέπει να παράγει χαμηλό επίπεδο επιβίωσης, ενώ η επιβίωση στη χαμηλότερη συγκέντρωση πρέπει να είναι κατά προσέγγιση η ίδια όπως και η επιβίωση στον αρνητικό μάρτυρα.

Οι σχετικά μη υδατοδιαλυτές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται μέχρι το όριο διαλυτότητάς τους με τη χρήση κατάλληλων διαδικασιών. Για εξαιρετικά υδατοδιαλυτές μη τοξικές ουσίες, η ανώτερη συγκέντρωση της ουσίας πρέπει να καθορίζεται κατά περίπτωση.

Διαδικασία

Τα κύτταρα πρέπει να εκτίθενται για κατάλληλη χρονική περίοδο, ανάλογα με το πειραματικό σύστημα που χρησιμοποιείται, το οποίο μπορεί να περιλαμβάνει ανανέωση των δόσεων με αλλαγή και του μέσου (και αν είναι αναγκαίο, νέο μείγμα μεταβολικής ενεργοποίησης) στην περίπτωση παράτασης της έκθεσης. Τα κύτταρα που δεν διαθέτουν επαρκή εγγενή μεταβολική δραστηριότητα πρέπει να εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία με και χωρίς κατάλληλο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης. Κατά το τέλος της περιόδου έκθεσης τα κύτταρα πλένονται για να απομακρυνθεί η δοκιμαζόμενη ουσία και καλλιεργούνται υπό συνθήκες κατάλληλες για την εμφάνιση του παρακολουθούμενου μετασχηματισμένου φαινοτύπου και για τον καθορισμό της συχνότητας εμφάνισης μετασχηματισμών. Όλα τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται με ανεξάρτητο πείραμα.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα και να μπορούν να παίρνουν μια ποικιλία μορφών ανάλογα με το εκτελούμενο πείραμα (π.χ. μέτρηση καλλιιεργειών μέσα σε αγάρ αγάρ, θετικές καλλιιεργείες ή αριθμός μετασχηματισμένων κυττάρων). Όπου χρειάζεται, η επιβίωση πρέπει να εκφράζεται σαν ποσοστό των επιπέδων ουσίας ελέγχου και η συχνότητα μετασχηματισμού να εκφράζεται σαν αριθμός των μετασχηματισμένων ανά αριθμό επιβιωσάντων.

Τα δεδομένα πρέπει να αξιολογούνται με τη χρήση κατάλληλης στατιστικής μεθόδου.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν, αριθμός καλλιιεργειών κυττάρων, μέθοδοι συντήρησης της καλλιιεργείας κυττάρων,
- συνθήκες διαδικασίας: συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας, έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε, χρόνος επώασης, διάρκεια και συχνότητα αγωγής, πυκνότητα κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγωγής, τύπος χρησιμοποιούμενου συστήματος εξωγενούς μεταβολικής ενεργοποίησης, θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι, προδιαγραφές του παρακολουθούμενου φαινοτύπου, επιλεγμένο σύστημα που χρησιμοποιείται (εάν χρειάζεται), αιτιολόγηση της επιλογής δόσεων,

B. 22

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟΥ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΟΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Οι επιδράσεις του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος προκαλούν εμβρυϊκούς θανάτους. Η επαγωγή θανατηφόρων επικρατούντων χαρακτήρων με έκθεση σε χημική ουσία δείχνει ότι η ουσία επηρέασε τον σπερμικό ιστό των πειραματόζωων. Είναι γενικά αποδεκτό ότι οι θανατηφόροι επικρατούντες χαρακτήρες οφείλονται σε χρωμοσωμική βλάβη (δομικές και αριθμητικές ανωμαλίες). Εάν η αγωγή παρέχεται στα θηλυκά, ο εμβρυϊκός θάνατος μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα τοξικών επιδράσεων. Γενικά, τα αρσενικά ζώα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία και ζευγαρώνονται με παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή. Οι διάφορες φάσεις των γαμετογόνων κυττάρων μπορούν να ελεγχθούν με αλληλοδιάδοχα διαστήματα ζευγαρώματος. Η αύξηση των νεκρών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό στην ομάδα αγωγής σε σύγκριση με τα νεκρά εμφυτεύματα ανά θηλυκό στην ομάδα μάρτυρα αντανάκλα την μετα-εμφυτευματική απώλεια. Η προ-εμφυτευματική απώλεια μπορεί να εκτιμηθεί με βάση τους αριθμούς των ωχρών σωματίων ή με σύγκριση των συνολικών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα που έχει υποστεί αγωγή και στην ομάδα ελέγχου. Η συνολική επίδραση του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος είναι το άθροισμα της προ- και μετα-εμφυτευματικής απώλειας. Ο υπολογισμός της συνολικής επίδρασης του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος βασίζεται στη σύγκριση των ζωντανών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα δοκιμασίας προς τα ζωντανά εμφυτεύματα ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα μάρτυρων. Η μείωση του αριθμού των εμφυτευμάτων σε ορισμένα διαστήματα μπορεί να είναι αποτέλεσμα θανάτωσης κυττάρων (π.χ. σπερματοκυττάρων ή/και σπερματογόνιων).

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες ουσίες πρέπει όπου είναι δυνατό να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε ισοτόνο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Χημικές ουσίες με υδατοδιαλυτές μπορούν να διαλυθούν ή να εναιωρηθούν σε κατάλληλα έκδοχα. Το χρησιμοποιούμενο έκδοχο πρέπει να μην αντιδρά με την πειραματική χημική ουσία ούτε να παράγει τοξικές επιδράσεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας.

Συνθήκες δοκιμασίας

Οδός χορήγησης

Η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει γενικά να χορηγείται *εφάπαξ*. Με βάση τις τοξικολογικές πληροφορίες, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πρόγραμμα επαναλαμβανόμενης αγωγής. Οι συνηθισμένες οδοί χορήγησης είναι η εισαγωγή από το στόμα ή η ενδοπεριτονική ένεση. Κατάλληλες μπορεί να είναι και άλλες οδοί χορήγησης.

Πειραματόζωα

Οι αρουραίοι ή οι ποντικοί συνιστώνται σαν πειραματικό είδος. Γίνεται τυχαία επιλογή σε υγιή ζώα πλήρους σεξουαλικής ωριμότητας, τα οποία τοποθετούνται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρων.

Αριθμός και φύλο

Πρέπει να χρησιμοποιείται επαρκής αριθμός ζώων για αγωγή, λαμβανομένης υπόψη της αυτογενούς μεταβολής του εκτιμώμενου βιολογικού χαρακτήρα. Ο αριθμός των επιλεγέντων ζώων πρέπει να βασίζεται στην προκαθορισμένη ευαισθησία ανίχνευσης και στο βαθμό σημαντικότητας. Για παράδειγμα, σε ένα τυπικό πείραμα, ο αριθμός των αρσενικών σε κάθε ομάδα δόσης πρέπει να είναι επαρκής για να δημιουργεί 30 έως 50 έγκυα θηλυκά ανά διάστημα ζευγαρώματος.

Χρήση αρνητικών και θετικών ελέγχων (μάρτυρες)

Σε κάθε πείραμα πρέπει συγχρόνως να γίνονται θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι (μάρτυρες). Όταν υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα θετικών ελέγχων από πρόσφατα πειράματα στο ίδιο εργαστήριο, τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντί ενός σύγχρονου θετικού ελέγχου. Οι ουσίες θετικού ελέγχου πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κατάλληλη χαμηλή δόση (π.χ. MMS, ενδοπεριτοναικά, σε 10 mg/kg) για την απόδειξη της ευαισθησίας της δοκιμασίας.

Επίπεδα δόσεων

Κανονικά πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Η υψηλή δόση πρέπει να παράγει σημεία τοξικότητας ή μειωμένη γονιμότητα στα ζώα που υφίστανται την αγωγή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένα μόνο επίπεδο υψηλής δόσης μπορεί να είναι επαρκές.

Οριακή δοκιμασία

Οι μη τοξικές ουσίες πρέπει να δοκιμάζονται σε 5 g/kg με εφάπαξ χορήγηση, ή σε 1 g/kg ανά ημέρα με επαναλαμβανόμενη χορήγηση.

Διαδικασία

Διατίθενται διάφορα προγράμματα αγωγής. Η εφάπαξ χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται ευρύτερα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα προγράμματα αγωγής.

Κάθε ένα από τα αρσενικά ζευγαρώνεται αλληλοδιάδοχα με ένα ή δύο παρθένα θηλυκά που δεν έχουν υποστεί αγωγή, σε κατάλληλα διαστήματα μετά την αγωγή. Τα θηλυκά πρέπει να αφεθούν με τα αρσενικά κατά τη διάρκεια ενός τουλάχιστον οιστρικού κύκλου ή μέχρι να επιτευχθεί το ζευγάρι που διαπιστώνεται από την παρουσία του σπέρματος στον κόλπο ή από την παρουσία βύσματος από πηγμένο σπέρμα στον κόλπο.

Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή διέπεται από το πρόγραμμα αγωγής και θα πρέπει να εξασφαλίζει τη λήψη δειγμάτων από όλες τις φάσεις του γαμετογόνου κυττάρου μετά την αγωγή.

Τα θηλυκά θανατώνονται κατά το δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης και το περιεχόμενο της μήτρας εξετάζεται για τον προσδιορισμό του αριθμού των νεκρών και ζωντανών εμφυτευμάτων. Οι ωθήκες μπορούν να εξετασθούν για τον προσδιορισμό του αριθμού των ωχρών σωματιών.

2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να παρίστανται με μορφή πίνακα για να δείχνουν τον αριθμό των αρσενικών, τον αριθμό των εγκύων θηλυκών και τον αριθμό των μη εγκύων θηλυκών ζώων. Τα αποτελέσματα κάθε ζευγαρώματος, συμπεριλαμβανομένης της ταυτότητας κάθε αρσενικού και θηλυκού, πρέπει να εκτίθενται χωριστά.

Για κάθε θηλυκό πρέπει να αναφέρεται η εβδομάδα ζευγαρώματος και για τα αρσενικά το επίπεδο δόσης, και να καταγράφονται οι συχνότητες των ζωντανών εμφυτευμάτων.

Ο υπολογισμός της συνολικής επίδρασης του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος βασίζεται στη σύγκριση των ζωντανών εμφυτευμάτων ανά θηλυκό ζώο στην ομάδα δοκιμασίας προς τα ζωντανά εμφυτεύματα ανά θηλυκό στην ομάδα μάρτυρα. Η σχέση των νεκρών προς τα ζωντανά εμφυτεύματα από την ομάδα που υφίσταται αγωγή συγκρινόμενη προς την ίδια σχέση της ομάδας μάρτυρα αναλύεται για να προκύψει η μετεμφυτευματική απώλεια.

Εάν τα δεδομένα καταγράφονται σαν πρόωμοι και καθυστερημένοι θάνατοι, αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί στους πίνακες. Πρέπει να αναφερθεί, εάν έχει εκτιμηθεί, η προ-εμφυτευματική απώλεια. Η προ-εμφυτευματική απώλεια μπορεί να υπολογιστεί σαν διαφορά μεταξύ του αριθμού των ωχρών σωματιών και του αριθμού των εμφυτευμάτων ή σαν μείωση του μέσου αριθμού των εμφυτευμάτων ανά μήτρα σε σύγκριση με τα ζευγαρώματα μάρτυρων.

Τα δεδομένα αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- είδος, στέλεχος, ηλικία και βάρος των χρησιμοποιούμενων ζώων, αριθμός των ζώων ανά φύλο στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα ελέγχου,
- δοκιμαζόμενη ουσία, έκδοχο, δοκιμαζόμενο επίπεδο δόσης και αιτιολόγηση της επιλογής δόσεων, αρνητικοί και θετικοί έλεγχοι, δεδομένα τοξικότητας,
- οδός και διάρκεια έκθεσης,
- πρόγραμμα ζευγαρώματος,
- μέθοδος για την διαπίστωση του ζευγαρώματος,
- χρόνος θανάτωσης,
- κριτήρια για την καταγραφή του θανατηφόρου επικρατούντος χαρακτήρος,
- σχέση δόσης/αποτελέσματος, εάν είναι δυνατόν,
- στατιστική αξιολόγηση,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B.23. ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντιγραφή της OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της *in vitro* δοκιμής σπερμογονιακής χρωμοσωμικής εκτροπής είναι ο εντοπισμός των ουσιών εκείνων που προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακά κύτταρα θηλαστικών (1)(2)(3)(4)(5). Οι δομικές εκτροπές μπορεί να είναι δύο τύπων, χρωμοσωμικές ή χρωματιδικές. Τα περισσότερα χημικά μεταλλαξογόνα προκαλούν εκτροπές χρωματιδικού τύπου, απαντώνται όμως και εκτροπές χρωμοσωμικού τύπου. Η παρούσα μέθοδος δεν έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση αριθμητικών εκτροπών και δεν χρησιμοποιείται συνήθως για το σκοπό αυτό. Οι χρωμοσωμικές μεταλλάξεις και τα συναφή συμβάντα αποτελούν το αίτιο πολλών γενετικών ασθενειών στον άνθρωπο.

Με την παρούσα δοκιμή μετρούνται χρωμοσωμικά συμβάντα σε σπερμογονιακά γεννητικά κύτταρα και, συνεπώς, πιστεύεται ότι μπορεί με αυτήν να προβλεφθεί η επαγωγή κληρονομικών μεταλλάξεων στα γεννητικά κύτταρα.

Στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά. Αυτή *in vivo* κυτταρογενετική δοκιμή ανιχνεύει χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακές μιτώσεις. Άλλα κύτταρα-στόχοι δεν εμπίπτουν στο θέμα της μεθόδου αυτής.

Για την ανίχνευση εκτροπών χρωματιδικού τύπου σε σπερμογονιακά κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζεται η πρώτη μιτωτική κυτταρική διαίρεση μετά την κατεργασία πριν οι αλλοιώσεις αυτές απωλεστούν στις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις. Πρόσθετες πληροφορίες από τα υποβληθέντα σε κατεργασία σπερμογονιακά βλαστοκύτταρα μπορούν να ληφθούν από μειωτική χρωμοσωμική ανάλυση για χρωμοσωμικού τύπου εκτροπές στο στάδιο της διακίνησης-μετάφασης I όταν τα υπό κατεργασία κύτταρα γίνουν σπερματοκύτταρα.

Αυτή *in vivo* δοκιμή έχει σχεδιαστεί για να διερευνάται αν μεταλλαξογόνα σωματικών κυττάρων είναι δραστικά και σε γεννητικά κύτταρα. Επιπλέον, η σπερμογονιακή δοκιμή σχετίζεται με την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξογένεσης δεδομένου ότι με αυτή μπορούν να εξεταστούν παράγοντες του *in vivo* μεταβολισμού, της φαρμακοκινητικής και των διεργασιών επιδιόρθωσης DNA.

Στους όρχεις υπάρχουν διάφορες γενεές σπερμογονίων με ένα ορισμένο φάσμα βαθμού ευαισθησίας στις χημικές ουσίες. Έτσι, οι εντοπιζόμενες εκτροπές αντιπροσωπεύουν τη συνολική απόκριση των υπό κατεργασία σπερμογονιακών κυτταρικών πληθυσμών, όπου δεσπόζουσα θέση καταλαμβάνουν τα πολυαριθμότερα διαφοροποιημένα σπερμογονιακά κύτταρα. Ανάλογα με τη θέση τους στους όρχεις, οι διάφορες γενεές σπερμογονίων μπορούν να εκθεθούν ή όχι στη γενική κυκλοφορία λόγω του φυσικού και φυσιολογικού φραγμού των Σερτολίων κυττάρων και του φραγμού αίματος-όρχεων.

Εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία, ή οι μεταβολίτες της, δεν πρόκειται να φθάσουν στον ιστό-στόχο, δεν είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται στη δοκιμή αυτή.

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρους Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Εκτροπή χρωματιδικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη μεμονωμένων χρωματιδών ή ρήξη και επανένωση μεταξύ χρωματιδών.

Εκτροπή χρωμοσωμικού τύπου: δομική χρωμοσωμική βλάβη που εμφανίζεται ως ρήξη, ή ρήξη και επανένωση, και των δύο χρωματιδών στην ίδια θέση.

Χάσμα: αχρωματική βλάβη μικρότερη από το πλάτος μιας χρωματίδας και με ελάχιστη απευθυγράμμιση των χρωματιδών.

Αριθμητική εκτροπή: μεταβολή του αριθμού των χρωμοσωμάτων από τον κανονικό χαρακτηριστικό αριθμό των χρησιμοποιούμενων κυττάρων.

Πολυπλοειδία: πολλαπλάσιο του απλοειδούς χρωμοσωμικού αριθμού (n) πέραν του διπλοειδούς αριθμού (δηλ. 3n, 4n κ.ο.κ).

Δομική εκτροπή: μεταβολή της δομής των χρωμοσωμάτων που ανιχνεύεται με παρατήρηση με μικροσκόπιο του σταδίου της μεταφάσεως της διαίρεσης των κυττάρων και γίνεται αντιληπτή με τη μορφή απαλείψεων και θραυσμάτων, ενδοανταλλαγών ή ανταλλαγών.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Τα ζώα εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία από μία κατάλληλη οδό εκθέσεως και θυσιάζονται σε κατάλληλες χρονικές στιγμές μετά την αγωγή. Πριν από τη θυσία, τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή με ένα παράγοντα αναστολής μεταφάσεως (π.χ. κολχικίνη ή Colcemid®). Στη συνέχεια, παρασκευάζονται παρασκευάσματα από γεννητικά κύτταρα, χρωματίζονται και τα μεταφασικά κύτταρα εξετάζονται προς εντοπισμό τυχόν χρωμοσωμικών εκτροπών.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1 Προετοιμασίες

1.4.1.1 Επιλογή ζωϊκών ειδών

Συνήθως χρησιμοποιούνται αρσενικοί κινέζικοι κρικητοί και ποντικοί. Εντούτοις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και αρσενικά από άλλα κατάλληλα είδη θηλαστικών. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους.

1.4.1.2 Συνθήκες στέγασης και διατροφής

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη Γενική Εισαγωγή του Μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60%.

1.4.1.3 Προετοιμασία των ζώων

Υγιή νεαρά ενήλικα αρσενικά χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Τα ζώα λαμβάνουν μία αποκλειστική για το καθένα ταυτότητα. Τα ζώα εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής.

1.4.1.4 Προετοιμασία των δόσεων

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2 Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1 Διαλύτης/φορέας

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα.

1.4.2.2 Μάρτυρες

Σε κάθε δοκιμή θα πρέπει να περιλαμβάνονται παράλληλα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες μαρτυρίας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή ομάδες.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές *in vivo* σε σπερμογονιακά κύτταρα σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο.

Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε οι επιδράσεις να είναι σαφείς αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας και να δειγματοποιούνται μόνο μία φορά. Εφόσον υπάρχουν, μπορεί να εξετάζεται η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης. Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Κυκλοφωσφαμίδιο	50-18-0	200-015-4
Μονοένυδρο κυκλοφωσφαμίδιο	6055-19-2	
Κυκλοεξυλαμίνη	108-91-8	203-629-0
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6
Μονομερές ακρυλαμίδιο	79-06-1	201-173-7
Τριαθυλενομελαμίνη	51-18-3	200-083-5

Για κάθε δειγματοληψία θα πρέπει να περιλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, υποβληθέντες σε αγωγή μόνο με διαλύτη ή φορέα αλλά με τον ίδιο κατά τα άλλα τρόπο με εκείνο των ομάδων της υπό δοκιμή ουσίας, εκτός κι αν από προϋπάρχοντα στοιχεία για τους μάρτυρες προκύπτουν αποδεκτές διαφοροποιήσεις και συχνότητες κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές μεταξύ των ζώων. Επιπλέον, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες εκτός αν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι ο επιλεγείς διαλύτης/φορέας δεν επιφέρει επιβλαβή ή μεταλλαξογόνα αποτελέσματα

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 Αριθμός ζώων

Κάθε υποβαλλόμενη σε αγωγή ομάδα και ομάδα-μάρτυρας πρέπει να αποτελείται από 5 τουλάχιστον προς εξέταση αρσενικά.

1.5.2 Χρονοδιάγραμμα αγωγής

Οι υπό δοκιμή ουσίες χορηγούνται κατά προτίμηση μία ή δύο φορές (δηλ. ως μία ή δύο αγωγές). Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορούν επίσης να χορηγηθούν και διακεκομμένα, δηλ. δύο αγωγές την ίδια ημέρα που να μην απέχουν χρονικά περισσότερο από μερικές ώρες, για να διευκολύνεται η χορήγηση μεγάλης ποσότητας ουσίας. Άλλοι τυχόν χρησιμοποιούμενοι τρόποι αγωγής θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικά.

Στην ομάδα στην οποία δίνεται η μεγαλύτερη δόση, γίνονται δύο δειγματοληψίες μετά την αγωγή. Επειδή η κινητική του κυτταρικού κύκλου μπορεί να επηρεαστεί από την υπό δοκιμή ουσία, πραγματοποιούνται μία πρώτη δειγματοληψία και μία δεύτερη δειγματοληψία αργότερα, 24 και 48 ώρες περίπου αντίστοιχα μετά την αγωγή. Για τις υπόλοιπες δόσεις, θα πρέπει να γίνεται μία δειγματοληψία στις 24 ώρες ή σε χρόνο που αντιστοιχεί στο 1,5 της χρονικής διάρκειας του κυτταρικού κύκλου μετά την αγωγή, εκτός κι αν είναι γνωστό ότι για την ανίχνευση των επιδράσεων είναι καταλληλότερος κάποιος άλλος χρόνος δειγματοληψίας (6).

Επιπλέον, μπορούν να πραγματοποιηθούν δειγματοληψίες και σε άλλες χρονικές στιγμές. Για παράδειγμα, στην περίπτωση ουσιών που μπορεί να επαγάγουν χρωμοσωμική υστέρηση, ή μπορεί να ασκήσουν S-ανεξάρτητες επιδράσεις, μπορεί να είναι καλό να γίνει νωρίτερα η δειγματοληψία (1).

Το αν πρέπει να υπάρξει ή όχι χρονοδιάγραμμα επανειλημμένης αγωγής, αυτό χρειάζεται να εξετάζεται κατά περίπτωση. Στην περίπτωση επανειλημμένης αγωγής, τα ζώα θα πρέπει να θυσιάζονται 24 ώρες (1,5 κυτταρικό κύκλο) μετά την τελευταία αγωγή. Όπου χρειάζεται, μπορούν να υπάρξουν πρόσθετες δειγματοληψίες σε άλλους χρόνους.

Πριν από τη θυσία, στα ζώα εγχύεται ενδοπεριτοναϊκά κατάλληλη δόση παράγοντα αναστολής μετάφρασης (π.χ. Colcemid® ή κολχικίνη). Σε κατάλληλη χρονική στιγμή πραγματοποιείται δειγματοληψία στα ζώα. Για τους ποντικούς, η καταλληλότερη στιγμή είναι περίπου 3-5 ώρες, ενώ για τους κινέζικους κρικητούς το διάστημα αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 4-5 ώρες.

1.5.3 Επίπεδα δόσεων

Εάν εκτελεστεί δοκιμή ανεύρεσης εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, αυτή θα πρέπει να εκτελείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή και τρόπο αγωγής που χρησιμοποιείται στην κύρια δοκιμή (7). Εφόσον υπάρχει τοξικότητα, στην πρώτη δειγματοληψία χρησιμοποιούνται τρία επίπεδα δόσεων. Τα επίπεδα αυτά δόσεων θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι τη χαμηλή ή μηδενική τοξικότητα. Για τη δεύτερη δειγματοληψία, αρκεί να χρησιμοποιείται μόνο η μέγιστη δόση. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση τον ίδιο τρόπο χορήγησης, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας.

Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στα σπερμογονιακά κύτταρα (π.χ. ελάττωση του λόγου των σπερμογονιακών μιτώσεων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφραση. Η ελάττωση αυτή δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 50%).

1.5.4 Δοκιμή οριακής δόσης

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να δώσει μία ένδειξη της ανάγκης για χρησιμοποίηση υψηλότερου επιπέδου δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5 Χορήγηση δόσεων

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης ή με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

1.5.6 Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων

Αμέσως μετά τη θυσία, λαμβάνονται από τον ένα ή και τους δύο όρχεις, εναιωρήματα κυττάρων που εκτίθενται σε υποτονικό διάλυμα και στερεώνονται. Τα κύτταρα κατόπιν επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρους πλάκες και χρωματίζονται.

1.5.7 Ανάλυση

Για κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον 100 καλώς αναπτυγμένες μεταφάσεις (δηλ. 500 κατ' ελάχιστο μεταφάσεις ανά ομάδα). Ο αριθμός αυτός μπορεί να μειωθεί όταν παρατηρείται υψηλός αριθμός εκτροπών. Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, θα πρέπει να λαμβάνουν έναν ανεξάρτητο κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Επειδή οι διαδικασίες στερέωσης απολήγουν συχνά στη ρήξη ενός ποσοστού μεταφάσεων με απώλεια χρωμοσωμάτων, τα καταμετρούμενα κύτταρα θα πρέπει να περιέχουν αριθμό κεντρομεριδίων ίσο με τον αριθμό $2n \pm 2$.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα στοιχεία θα πρέπει να παρουσιάζονται με μορφή πίνακα για τα επιμέρους ζώα. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Για κάθε ζώο θα πρέπει να εκτιμάται ο αριθμός των κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές και ο αριθμός των εκτροπών ανά κύτταρο. Οι διάφοροι τύποι δομικών χρωμοσωμικών εκτροπών θα πρέπει να καταγράφονται με τον αριθμό και τη συχνότητά τους στις υποβληθείσες σε αγωγή και στις ομάδες-μάρτυρες. Τα χάσματα καταγράφονται ξεχωριστά και περιλαμβάνονται στην έκθεση, γενικά όμως δεν περιλαμβάνονται στη συνολική συχνότητα εκτροπών.

Εφόσον παρατηρηθεί μίτωση καθώς επίσης και μείωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο λόγος των μιτώσεων σπερμογονίων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση ως μέτρο της κυτταροτοξικότητας για όλα τα υποβληθέντα σε αγωγή ζώα και αρνητικούς μάρτυρες σε συνολικό δείγμα 100 διαμεμένων κυττάρων ανά ζώο για τον προσδιορισμό της δυνατής κυτταροτοξικής επίδρασης. Εφόσον παρατηρείται μόνο μίτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο δείκτης μιτώσεως σε 1000 τουλάχιστον κύτταρα για κάθε ζώο.

Για να θεωρηθεί ένα αποτέλεσμα ως θετικό εφαρμόζονται διάφορα κριτήρια όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση στο σχετικό αριθμό κυττάρων με χρωμοσωμικές εκτροπές ή η σαφής αύξηση στον αριθμό των κυττάρων με εκτροπές σε ομάδα μίας μόνης δόσης σε μία μόνη δειγματοληψία. Πρώτα θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των αποτελεσμάτων. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι (8). Σε μία θετική απόκριση δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα. Τυχόν διαφορούμενα αποτελέσματα θα πρέπει να διασαφηνίζονται με περαιτέρω δοκιμές τροποποιώντας, κατά προτίμηση, τις πειραματικές συνθήκες.

Εφόσον τα αποτελέσματα για μία υπό δοκιμή ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια, η ουσία αυτή θεωρείται ως μη μεταλλαξογόνος στη δοκιμή αυτή.

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστικότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διαφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από την *in vivo* δοκιμή σπερμογονιακής χρωμοσωμικής εκτροπής δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία επάγει δομικές χρωμοσωμικές εκτροπές στα γεννητικά κύτταρα των εξετασθέντων ειδών. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν επάγει χρωμοσωμικές εκτροπές στα γεννητικά κύτταρα των εξετασθέντων ειδών.

Θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα της υπό δοκιμή ουσίας ή των μεταβολιτών της στον ιστό στόχο.

3.

ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/Φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέας, εφόσον είναι γνωστές,

Εξετασθέντα ζώα:

- χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,
- αριθμό και ηλικία των ζώων,
- πηγή, συνθήκες στέγασης, δίαιτα, κλπ,
- βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρους των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα

Συνθήκες δοκιμής:

- στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,
- αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δόσεως,
- αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολογία του χρονικού σημείου της θυσίας
- μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη δίαιτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού
- λεπτομερή περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,
- μεθόδους για τις μετρήσεις της τοξικότητας,
- ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφρασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,
- μεθόδους ετοιμασίας αντικειμενοφόρων,
- κριτήρια για τη μέτρηση των εκτροπών,
- αριθμό εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διαφορούμενης.

Αποτελέσματα:

- σημάδια τοξικότητας,
- μιτωτικό δείκτη,
- λόγο σπερμογονιακών μιτώσεων προς πρώτη και δεύτερη μειωτικές μεταφάσεις,
- τύπο και αριθμό εκτροπών ξεχωριστά για κάθε ζώο,
- ολικό αριθμό εκτροπών ανά ομάδα,
- αριθμό κυττάρων με εκτροπές ανά ομάδα,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,
- στατιστικές αναλύσεις, εφόσον υπάρχουν,
- παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς μάρτυρες,
- προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.
- παράλληλα στοιχεία για τους θετικούς μάρτυρες,
- αλλαγές στην πλοειδία, εφόσον παρατηρήθηκαν.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
3. Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.
4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
5. Yamamoto, K. and 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. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
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. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.
8. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 24

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΗΛΙΔΑΣ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Πρόκειται για μια δοκιμασία in vivo σε ποντικούς στους οποίους τα αναπτυσσόμενα έμβρυα εκτίθενται στις χημικές ουσίες. Τα κύτταρα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης στα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι οι μελανοβλάστες, τα δε γονίδια που αποτελούν στόχο του πειράματος είναι εκείνα που ελέγχουν τη χρώση του τριχώματος. Τα αναπτυσσόμενα έμβρυα είναι ετερόζυγα για ορισμένο αριθμό αυτών των γονιδίων χρώσης του τριχώματος. Μετάλλαξη ή απώλεια του επικρατούς αλληλόμορφου ενός τέτοιου γονιδίου σε μελανοβλάστη έχει σαν αποτέλεσμα, την έκφραση του υπολειπομένου φαινοτύπου στα κατώτερα κύτταρα του που συνίσταται από μία κηλίδα μεταβληθέντος χρώματος στο τρίχωμα του προκύπτοντος ποντικού. Ο αριθμός των απογόνων με τέτοιες κηλίδες και μεταλλάξεις καταγράφεται και η συχνότητά τους συγκρίνεται με εκείνη μεταξύ των απογόνων που προκύπτουν από έμβρυα τα οποία υπέστησαν αγωγή μόνο με το διαλύτη. Η δοκιμασία κηλίδας σε ποντικό ανιχνεύει υποτιθέμενες σωματικές μεταλλάξεις σε εμβρυικά κύτταρα.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Όπου είναι δυνατόν, οι δοκιμαζόμενες ουσίες διαλύονται ή εναεωρούνται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Οι χημικές ουσίες που είναι αδιάλυτες στο νερό διαλύονται ή εναεωρούνται σε κατάλληλα έκδοχα. Το χρησιμοποιούμενο έκδοχο δεν πρέπει ούτε να αντιδρά με την δοκιμαζόμενη χημική ουσία ούτε να παράγει τοξικές επιδράσεις. Πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας.

Πειραματόζωα

Οι ποντικοί του στελέχους T (nonagouti a/a' chinchilla, pink eye, c^{ch} p/c^{ch} p; brown, b/b, dilute, short ear, d se/d se' riebald spotting, s/s) ζευγαρώνονται είτε με ποικιλία στελέχους HT (pallid, nonagouti, brachyrody, pa a bp/pa a bp' leaden fuzzy, ln fz/ln fz' pearl pe/pe) ή με C 57 BL (nonagouti, a/a). Άλλες κατάλληλες διασταυρώσεις όπως είναι μεταξύ NMRI (nonagouti, a/a' albino c/c) και DBA (nonagouti, a/a' brown b/b' dilute d/d) μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρκεί να παράγουν απογόνους nonagouti.

Αριθμός και φύλο

Επαρκής αριθμός εγκύων θηλυκών ζώων υφίστανται αγωγή για να υπάρξει κατάλληλος αριθμός επίζωντων απογόνων για κάθε χρησιμοποιούμενο επίπεδο δόσης. Το κατάλληλο μέγεθος δείγματος διέπεται από τον αριθμό των κηλίδων που παρατηρούνται στους ποντικούς που υφίστανται αγωγή και από την κλίμακα των δεδομένων του μάρτυρα. Αρνητικό αποτέλεσμα είναι αποδεκτό μόνο όταν καταγράφηκαν 300 τουλάχιστον απόγονοι από θηλυκά που υπέστησαν αγωγή με την υψηλότερη δόση.

Θετικοί και αρνητικοί έλεγχοι με μάρτυρες

Συγχρόνως με τη δοκιμασία πρέπει να γίνονται έλεγχοι με ποντικούς που υπέστησαν αγωγή μόνο με το έκδοχο (αρνητικοί έλεγχοι). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστορικά δεδομένα ελέγχου από το ίδιο εργαστήριο για την αύξηση της ευαισθησίας της δοκιμασίας, υπό τον όρο ότι τα δεδομένα θα είναι ομογενή. Εάν η δοκιμαζόμενη χημική

ουσία δεν δείχνει καθόλου μεταλλαξιογενετικότητα, πρέπει να διατίθενται συγκρίσιμα δεδομένα θετικού ελέγχου, τα οποία έχουν ληφθεί πρόσφατα στο ίδιο εργαστήριο, από την αγωγή με μια χημική ουσία η οποία να είναι γνωστό ότι παρουσιάζει μεταλλαξιογενετικότητα στη δοκιμασία αυτή.

Οδός χορήγησης

Οι συνήθεις οδοί χορήγησης είναι ο καθετρισμός από το στόμα και η ενδοπεριτονιακή ένεση των εγκύων θηλυκών. Η αγωγή με εισπνοή ή με άλλες οδούς χορήγησης χρησιμοποιείται, όταν είναι δυνατόν.

Επίπεδα δόσεων

Δύο τουλάχιστον επίπεδα δόσεων χρησιμοποιούνται, συμπεριλαμβανομένου ενός επιπέδου που δείχνει σημεία τοξικότητας ή μειωμένο αριθμό εμβρύων της ίδιας μητέρας. Για μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιείται η έκθεση στην ανώτατη πρακτικά δυνατή δόση.

Διαδικασία

Μία μοναδική αγωγή εφαρμόζεται κανονικά την όγδοη, ένατη και δέκατη ημέρα της εγκυμοσύνης, λαμβανομένης υπόψη σαν ημέρας 1 της ημέρας κατά την οποία παρατηρείται για πρώτη φορά το πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Οι ημέρες αυτές αντιστοιχούν στις ημέρες 7,25, 8,25 και 9,25 μετά τη σύλληψη. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαδοχικές αγωγές μετά από αυτές τις ημέρες.

Ανάλυση

Οι απόγονοι κωδικοποιούνται και καταγράφονται για χρωματιστές κηλίδες μετά τρεις και τέσσερις εβδομάδες από τη γέννηση. Διακρίνονται τρεις κλάσεις κηλίδων:

- α) λευκές κηλίδες εντός 5 mm από την ημικοιλιακή γραμμή που υποτίθεται ότι προκύπτουν από τη θανάτωση κυττάρων (WMVS)
- β) κίτρινες, που ομοιάζουν με φαϊές (agouti-like), κηλίδες που σχετίζονται με τους μαστούς, το λαϊμό, τις μασγαλιαίες και βουβωνικές χώρες και το μέτωπο, οι οποίες υποτίθεται ότι προκύπτουν από κακή διαφοροποίηση των κυττάρων (misdifferentiation) (MDS)
- γ) χρωματιστές και λευκές κηλίδες, τυχαία κατανεμημένες πάνω στο τρίχωμα, που υποτίθεται ότι προκύπτουν από σωματικές μεταλλάξεις (RS).

Και οι τρεις κλάσεις καταγράφονται, αλλά μόνο η τελευταία (RS) έχει γενετική σημασία. Τα προβλήματα της διάκρισης μεταξύ των κηλίδων MDS και RS μπορούν να επιλυθούν με φθορίζουσα μικροσκοπική εξέταση δείγματος του τριχώματος. Οι μακροσκοπικά εμφανείς μορφολογικές ανωμαλίες των απογόνων πρέπει να σημειωθούν.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα παρίστανται σαν συνολικός αριθμός καταγραφέντων απογόνων, και σαν αριθμός ζώων που έχουν μια ή περισσότερες κηλίδες υποτιθέμενης σωματικής μετάλλαξης. Τα δεδομένα της αγωγής και του αρνητικού ελέγχου συγκρίνονται χρησιμοποιώντας στατιστικές μεθόδους.

3. ΣΥΝΤΑΣΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διασταύρωση,
- αριθμός εγκύων θηλυκών στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα μάρτυρα,
- μέσος αριθμός γεογνών κατά μήτερα στις ομάδες δοκιμασίας και στις ομάδες μάρτυρες κατά τη γέννηση και κατά τον απογαλακτισμό,
- επίπεδα δόσεων της δοκιμαζόμενης χημικής ουσίας,
- διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε,

- ημέρα εγκυμοσύνης κατά την οποία διενεργήθηκε η χορήγηση,
- οδός χορήγησης,
- συνολικός αριθμός καταγραφέντων απογόνων και αριθμός με WMVS, MDS και RS στην ομάδα δοκιμασίας και στην ομάδα μάρτυρα,
- μακροσκοπικές μορφολογικές ανωμαλίες,
- σχέση δόσης/αποτελέσματος των RS, όπου είναι δυνατόν,
- στατιστική αξιολόγηση,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 25

ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΙΜΗ ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΟΝΤΙΚΟΥΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμασία κληρονομής μετατόπισης γονιδίων σε ποντικούς ανιχνεύει τις δομικές και αριθμητικές μεταβολές χρωμοσωμάτων σε γεννητικά κύτταρα θηλαστικών που ανακαλύπτονται στους απογόνους της πρώτης γενιάς. Οι τύποι των μεταβολών χρωμοσωμάτων είναι αντίστοιχες μετατοπίσεις και, στην περίπτωση που συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι, απώλεια Χ-χρωμοσωμάτων. Οι φορείς των μετατοπίσεων και ΧΟ-θηλυκά δείχνουν μειωμένη γονιμότητα και συνηθίζεται να επιλέγονται οι απόγονοι F₁ για κυτταρογενετική ανάλυση. Πλήρης στερότητα προκαλείται από ορισμένους τύπους μετατοπίσεων (τύπου Χ-αυτοσωματικό και c-t). Οι μετατοπίσεις παρατηρούνται κυτταρογενετικά στα μειωτικά κύτταρα στη διακίνηση-μετάφαση I των αρσενικών ατόμων, είτε στα αρσενικά της ομάδας F₁ είτε στους υιούς των θηλυκών της ομάδας F₁. Τα θηλυκά ΧΟ διαπιστώνονται κυτταρογενετικά από την παρουσία 39 μόνο χρωμοσωμάτων στις μετώσεις του μυελού οστών.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προετοιμασία

Οι δοκιμαζόμενες χημικές ουσίες διαλύονται σε ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου. Εάν είναι αδιάλυτες, τότε διαλύονται ή εναπορούνται σε κατάλληλα έκδοχα. Χρησιμοποιούνται πρόσφατα διαλύματα της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη διευκόλυνση της λήψης, δεν πρέπει να αντιδρά με την δοκιμαζόμενη ουσία ή να προκαλεί τοξικές επιδράσεις.

Οδός χορήγησης

Σαν οδοί χορήγησης συνήθως χρησιμοποιούνται ο καθετηριασμός από το στόμα ή η ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Και άλλες οδοί χορήγησης μπορεί να είναι κατάλληλες.

Πειραματόζωα

Για τη διευκόλυνση της αναπαραγωγής και της κυτταρολογικής επαλήθευσης, τα πειράματα αυτά εκτελούνται με ποντικούς. Δεν απαιτείται ιδιαίτερο στέλεχος ποντικών. Ωστόσο ο μέσος αριθμός εμβρύων από την έγκυο μητέρα της ποικιλίας που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι μεγαλύτερος από οκτώ και θα πρέπει να είναι σχετικά σταθερός. Χρησιμοποιούνται υγιή, σεξουαλικά ώριμα ζώα.

Αριθμός ζώων

Ο αριθμός των αναγκαίων ζώων εξαρτάται από τη συχνότητα αυθόρμητης μετατόπισης και από τον ελάχιστο ρυθμό επαγωγής που απαιτείται για την επίτευξη θετικού αποτελέσματος.

Το πείραμα εκτελείται συνήθως με ανάλυση των αρσενικών απογόνων της ομάδας F₁. 300 τουλάχιστον αρσενικοί απόγονοι της ομάδας F₁ πρέπει να περιληφθούν σε κάθε ομάδα δόσης. Εάν συμπεριλαμβάνονται θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F₁, απαιτούνται 300 αρσενικά και 300 θηλυκά.

Χρήση αρνητικών και θετικών μαρτύρων

Πρέπει να υπάρχουν επαρκή δεδομένα μαρτύρων, εξαγόμενα τόσο από τη δοκιμασία όσο και από ιστορικά στοιχεία. Όταν υπάρχουν αποδεκτά αποτελέσματα θετικών μαρτύρων από πρόσφατα πειράματα στο ίδιο εργαστήριο, τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αντικαταστήσουν τη σύγχρονη χρήση θετικών μαρτύρων.

Επίπεδο δόσεων

Χρησιμοποιείται ένα επίπεδο δόσης, συνθέστερα η υψηλότερη δόση που συνδέεται με την παραγωγή ελάχιστων τοξικών επιδράσεων αλλά χωρίς να επηρεάζει την αναπαραγωγική συμπεριφορά ή την επιβίωση. Για τον καθορισμό της σχέσης δόσης/αποτελέσματος απαιτούνται δύο πρόσθετες χαμηλότερες δόσεις. Για μη τοξικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιηθεί η έκθεση στην ανώτατη δυνατή δόση.

Διαδικασία

Αγωγή και ζευγάρωμα

Δύο προγράμματα αγωγής υπάρχουν. Η εφάπαξ χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας χρησιμοποιείται ευρύτερα. Η χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας επί 35 ημέρες με βάση την εβδομάδα επτά ημερών μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί. Ο αριθμός των ζευγαρωμάτων μετά την αγωγή διέπεται από το πρόγραμμα αγωγής και πρέπει να εξασφαλίζει τη λήψη δειγμάτων από όλες τις φάσεις των γεννητικών κυττάρων που υφίστανται την αγωγή. Κατά το τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος, τα θηλυκά τοποθετούνται σε κλωβούς χωριστά. Όταν τα θηλυκά γεννήσουν, καταγράφεται η ημερομηνία, ο αριθμός των νεογνών και το φύλο τους. Όλοι οι αρσενικοί απόγονοι απογαλακίζονται ενώ οι θηλυκές απόγονοι απορρίπτονται, εκτός εάν συμπεριλαμβάνονται στο πείραμα.

Δοκιμασία για ετεροζυγωτικότητα μετατόπισης

Χρησιμοποιείται μία από τις δύο δυνατές μεθόδους:

- Δοκιμασία γονιμότητας των απογόνων της ομάδας F_1 και μετέπειτα επαλήθευση των πιθανών φορέων μετατόπισης με κυτταρογενετική ανάλυση.
- Κυτταρογενετική ανάλυση όλων των αρσενικών απογόνων της ομάδας F_1 χωρίς προηγούμενη επιλογή με τεστ γονιμότητας.

α) Δοκιμασία γονιμότητας

Η μειωμένη γονιμότητα ενός ζώου της ομάδας F_1 μπορεί να προσδιοριστεί με την παρατήρηση του αριθμού των νεογνών ή/και την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που έχουν ζευγαρώσει.

Τα κριτήρια προσδιορισμού της κανονικής και μειωμένης γονιμότητας καθορίζονται για το στέλεχος ποντικών που χρησιμοποιείται.

Παρατήρηση του αριθμού των νεογνών από την ίδια μητέρα: Τα αρσενικά της ομάδας F_1 που θα χρησιμοποιηθούν στη δοκιμασία τοποθετούνται χωριστά σε κλωβούς με θηλυκά είτε από το ίδιο πείραμα είτε από την αποικία. Οι κλωβοί επιθεωρούνται καθημερινά, αρχίζοντας 18 ημέρες μετά το ζευγάρωμα. Ο αριθμός των νεογνών από την ίδια μητέρα και το φύλο των απογόνων της ομάδας F_2 καταγράφονται κατά τη γέννηση και εν συνεχεία τα νεογνά απορρίπτονται. Εάν εξετάζονται οι θηλυκοί απόγονοι της ομάδας F_1 , οι απόγονοι F_2 των μικρών νεογνών διατηρούνται για παραπέρα δοκιμασία. Οι θηλυκοί φορείς μετατόπισης επαληθεύονται με κυτταρογενετική ανάλυση μετατόπισης σε οποιονδήποτε από τους αρσενικούς απογόνους τους. Τα θηλυκά ΧΟ αναγνωρίζονται από τη μεταβολή στην αναλογία φύλου μεταξύ των απογόνων τους από 1:1 έως 1:2 αρσενικά προς θηλυκά. Σε μία αλληλοδιάδοχη διαδικασία, τα κανονικά ζώα F_1 απομακρύνονται από παραπέρα δοκιμασία εάν η πρώτη ομάδα νεογνών από την ίδια μητέρα F_2 φθάσει ή υπερβεί την προκαθορισμένη κανονική τιμή, αλλιώς παρατηρείται μία δεύτερη ή τρίτη ομάδα νεογνών F_2 από την ίδια μητέρα.

Τα ζώα της ομάδας F_1 που δεν μπορούν να χαρακτηριστούν κανονικά μετά από παρατήρηση μέχρι τριών ομάδων νεογνών F_2 , δοκιμάζονται παραπέρα με ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας των θηλυκών που υπέστησαν αγωγή ή με απευθείας υποβολή σε κυτταρογενετική ανάλυση.

Ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας: Η μείωση στον αριθμό νεογνών των φορέων μετατόπισης οφείλεται σε εμβρυϊκό θάνατο έτσι ώστε ένας υψηλός αριθμός νεκρών εμφυτευμάτων είναι ενδεικτικός για την παρουσία μετατόπισης στο δοκιμαζόμενο ζώο. Τα αρσενικά της ομάδας δοκιμής F_1 , ζευγαρώνονται με δύο έως τρία θηλυκά το καθένα. Η σύλληψη προσδιορίζεται με καθημερινή επίθεωρηση για την εύρεση πηγμένου σπέρματος μέσα στον κόλπο το πρωί. Τα θηλυκά θανατώνονται μετά από 14 έως 16 ημέρες και καταγράφονται τα ζωντανά και νεκρά εμφυτεύματα μέσα στη μήτρα τους.

β) Κυτταρογενετική ανάλυση

Ετοιμάζονται παρασκευάσματα ορχών με τη μέθοδο αφυδάτωσης, με τη βοήθεια του αέρα. Οι φορείς μετατόπισης τακτοποιούνται από την παρουσία πολυθενών διατάξεων στη διακίνηση-μέταφαση I στα αρχέτυπα σπερματοκύτταρα. Η παρατήρηση δύο τουλάχιστον κυττάρων με πολυθενή σύνδεσμο συνιστά την απαιτούμενη απόδειξη ότι το δοκιμασθέν ζώο είναι φορέας μετατόπισης.

Εάν δεν έχει γίνει επιλογή ζευγαρώματος όλα τα αρσενικά της ομάδας F₁ επιθεωρούνται κυτταρογενετικά. Πρέπει να καταγραφεί μικροσκοπικά ένας ελάχιστος αριθμός 25 διακινήσεων-μεταφάσεων I ανά αρσενικό. Η εξέταση των μιτωτικών μεταφάσεων, της σπερματογονίας ή του μυελού οστών απαιτείται για τα αρσενικά της ομάδας F₁ με μικρούς όρχεις και μειωτικό διαχωρισμό πριν τη διακίνηση ή από θηλυκά ΧΟ της ομάδας F₁ για τα οποία υπάρχει σχετική υποψία. Η παρουσία ασυνήθιστα μακρού ή/και βραχέος χρωμοσώματος σε κάθε ένα από τα δέκα κύτταρα αποτελεί απόδειξη ιδιαίτερης στερωτικής μετατόπισης αρσενικού (c-t type). Μερικές μετατοπίσεις Χ-αυτοσωμικών που προκαλούν στειρότητα αρσενικών μπορεί να προσδιοριστούν μόνο με τη μέθοδο ζωνώσεως (banding) με μελέτη των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Η παρουσία 39 χρωμοσωμάτων και στις δέκα μιτώσεις αποτελεί απόδειξη της κατάστασης ΧΟ σε ένα θηλυκό.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα παρίστανται με μορφή πίνακα.

Ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα και η σχέση φύλου από μητρικά ζευγαρώματα κατά τη γέννηση και κατά τον απογαλακτισμό αναφέρονται για κάθε χρονικό διάστημα ζευγαρώματος.

Για την εκτίμηση της γονιμότητας των ζώων της ομάδας F₁ δίνονται ο μέσος αριθμός της ομάδας νεογνών από την ίδια μητέρα όλων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ομάδων νεογνών F₁ από την ίδια μητέρα των φορέων μετατόπισης. Για την ανάλυση του περιεχομένου της μήτρας δίνεται ο μέσος αριθμός των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων των κανονικών ζευγαρωμάτων και οι αριθμοί χωριστά των ζωντανών και νεκρών εμφυτευμάτων για κάθε ζευγάρι των φορέων μετατόπισης της ομάδας F₁.

Για την κυτταρογενετική ανάλυση της διακίνησης-μετάφασης I καταγράφονται οι αριθμοί των τύπων πολυσθενών διατάξεων και ο συνολικός αριθμός κυττάρων για κάθε φορέα μετατόπισης.

Για τα στείρα ζώα της ομάδας F₁ αναγράφεται ο συνολικός αριθμός των ζευγαρωμάτων και η διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος.

Δίνονται τα βάρη των όρχεων και οι λεπτομέρειες της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Για τα θηλυκά της ομάδας ΧΟ, αναφέρεται ο μέσος αριθμός νεογνών από την ίδια μητέρα, η αναλογία φύλου των απογόνων της ομάδας F₂ και τα αποτελέσματα της κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Εάν οι πιθανοί φορείς μετατόπισης της ομάδας F₁ προεπιλέγονται με δοκιμασίες γονιμότητας, οι πίνακες πρέπει να περιλαμβάνουν πληροφορίες για τον αριθμό εκείνων που επιβεβαιώθηκαν ότι είναι ετεροζυγώτες μετατόπισης. Τα δεδομένα από πειράματα αρνητικών ελέγχων και θετικών ελέγχων με μάρτυρες αναφέρονται κατά τον ίδιο τρόπο.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Στην έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνονται οι παρακάτω πληροφορίες:

- στελέχη των ποντικών, ηλικία των ζώων, βάρη των ζώων που υπέστησαν την αγωγή,
- αριθμοί των μητρικών ζώων κάθε φύλου της ομάδας δοκιμασίας και της ομάδας μάρτυρα,
- συνθήκες της δοκιμασίας, λεπτομερής περιγραφή της αγωγής, επίπεδα δόσεων, διαλύτες, πρόγραμμα ζευγαρώματος,
- αριθμός και φύλο των απογόνων ανά θηλυκό ζώο, αριθμός και φύλο των απογόνων που αναπτύχθηκαν για ανάλυση μετατόπισης,
- χρόνος και κριτήρια ανάλυσης μετατόπισης,
- αριθμός και λεπτομερής περιγραφή των φορέων μετατόπισης, συμπεριλαμβανομένων δεδομένων διατροφής και δεδομένων περιεχομένου μήτρας, εάν είναι δυνατόν,
- κυτταρογενετικές διαδικασίες και λεπτομέρειες μικροσκοπικής ανάλυσης, κατά προτίμηση με εικόνες,
- στατιστική αξιολόγηση,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B.26. ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος μελέτης της υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών λαμβανόμενων από το στόμα αποτελεί επανάληψη της μεθόδου TG 408 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας χημικής ουσίας, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η υποχρόνια τοξικότητα της ουσίας λαμβανόμενης από το στόμα με επαναλαμβανόμενες δόσεις αφού πρώτα έχουν ληφθεί αρχικές πληροφορίες όσον αφορά την τοξικότητα της ουσίας με δοκιμασίες οξείας τοξικότητας ή τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών. Με τη μελέτη 90 ημερών λαμβάνονται πληροφορίες για πιθανούς κινδύνους για την υγεία οι οποίοι ενδεχομένως προκύβουν λόγω επαναλαμβανόμενης έκθεσης επί παρατεταμένο χρονικό διάστημα το οποίο καλύπτει την περίοδο από την ωρίμαση μετά την αποκοπή μέχρι την ανάπτυξη έως την πλήρη ενηλικίωση. Από τη μελέτη θα προκύβουν στοιχεία για τις κύριες τοξικές επιπτώσεις καθώς και ενδείξεις για τα όργανα-στόχους και για την πιθανότητα συσσώρευσης· μπορεί επίσης να προκύψει εκτίμηση για ένα επίπεδο έκθεσης στο οποίο δεν παρατηρείται τοξική επίπτωση (no-observed-adverse-effect level) και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των δόσεων για χρόνιες μελέτες και για τη θέσπιση κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου.

Στη μέθοδο δίνεται επιπλέον έμφαση στα σημεία των νευρικών απολήξεων και από αυτήν συνάγονται ενδείξεις για τις επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Υπογραμμίζεται επίσης η ανάγκη για προσεκτική κλινική παρατήρηση των ζώων, προκειμένου να ληφθεί ο μεγαλύτερος δυνατός αριθμός πληροφοριών. Η μελέτη πρέπει να επιτρέπει τον προσδιορισμό των χημικών ουσιών που διαθέτουν το δυναμικό πρόκλησης νευροτοξικών ή ανοσολογικών επιπτώσεων ή επιπτώσεων στα αναπαραγωγικά όργανα οι οποίες ενδεχομένως απαιτούν περαιτέρω σε βάθος διερεύνηση.

Βλέπε επίσης: Γενική Εισαγωγή Μέρος Β

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Δόση: είναι η χορηγούμενη ποσότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος (g, mg) ή σε βάρος δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου (π.χ. mg/kg), ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στην τροφή (ppm).

Δοσολογία: είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

NOAEL: πρόκειται για συντομογραφία του "no-observed-adverse-effect level" και είναι η υψηλότερη δόση με την οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται από το στόμα ημερησίως σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την περίοδο χορήγησης της αγωγής, τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας υποβάλλονται σε νεκροψία και, στο τέλος της δοκιμασίας, τα επιζήσαντα ζώα θανατώνονται και επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1 Προετοιμασία των ζώων

Χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, τα οποία έχουν εγκλιματισθεί στις εργαστηριακές συνθήκες για 5 τουλάχιστον ημέρες και δεν έχουν υποβληθεί σε προηγούμενους πειραματικούς χειρισμούς. Τα πειραματόζωα χαρακτηρίζονται με βάση το είδος, την ποικιλία, την προέλευση, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία. Τα πειραματόζωα κατανέμονται με τυχαία επιλογή σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων. Οι κλωβοί τοποθετούνται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν επιδράσεις οφειλόμενες στον τρόπο τοποθέτησης. Σε κάθε ζώο αποδίδεται ένας μοναδικός αναγνωριστικός αριθμός.

1.4.2 Παρασκευή των δόσεων

Η υπό δοκιμή ουσία μπορεί να χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή στην τροφή ή στο πόσιμο νερό. Η μέθοδος χορήγησης από το στόμα εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας.

Όταν χρειάζεται, δημιουργείται διάλυμα ή εναιώρημα της δοκιμαζόμενης ουσίας σε κατάλληλο έκδοχο. Συνιστάται, όταν είναι εφικτό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υδατικό διάλυμα/εναιώρημα, κατόπιν διάλυμα/γαλάκτωμα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τέλος η διάλυση σε άλλα έκδοχα. Πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά των άλλων (πλύν του ύδατος) εκδόχων. Πρέπει να καθορίζεται η σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας υπό τις συνθήκες χορήγησης.

1.4.3 Συνθήκες δοκιμασίας

1.4.3.1 Πειραματόζωα

Το προτιμώμενο είδος είναι ο επίμυς (αρουραίος), παρόλο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη τρωκτικών, π.χ. μύες. Χρησιμοποιούνται ποικιλίες νεαρών υγιών ενήλικων ζώων από αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται σε εργαστήρια. Τα θηλυκά ζώα πρέπει να μην εγκυμονούν και να μην έχουν εγκυμονήσει στο παρελθόν. Η χορήγηση των δόσεων ξεκινά αμέσως μετά τον απογαλακτισμό και, οπωσδήποτε, πριν τα ζώα φθάσουν σε ηλικία εννέα εβδομάδων. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα χρησιμοποιούμενα ζώα δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους κάθε φύλου. Όταν η μελέτη διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, πρέπει και στις δύο μελέτες να χρησιμοποιηθούν ζώα ίδιας ποικιλίας και προέλευσης.

1.4.3.2 Αριθμός και φύλο

Για κάθε δόση (επίπεδο) χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 20 ζώα (δέκα θηλυκά και δέκα αρσενικά). Εάν σχεδιάζονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Με βάση όσα είναι ήδη γνωστά για τη χημική ουσία ή άλλη ουσία που εμφανίζει σημαντικές με αυτήν αναλογίες, εξετάζεται η περίπτωση να περιληφθεί πρόσθετη δοκιμαστική ομάδα δέκα ζώων (πέντε ανά φύλο), στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της υψηλότερης δόσης για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις εμμένουν ή αναστρέφονται μετά την περίοδο της αγωγής. Η διάρκεια της μετά την αγωγή περιόδου καθορίζεται με κατάλληλο τρόπο, ανάλογα με τις επιπτώσεις που θα παρατηρηθούν.

1.4.3.3 Δόσεις

Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ένας μάρτυρας, πλην των περιπτώσεων όπου εκτελείται οριακή δοκιμή (βλέπε 1.4.3.4). Η επιλογή των δόσεων μπορεί να βασιστεί στα αποτελέσματα μελετών επαναλαμβανόμενης δόσης ή εντοπισμού εύρους τιμών και πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα διαθέσιμα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που αφορούν τη δοκιμαζόμενη ουσία ή συναφείς ουσίες. Εκτός από τις περιπτώσεις όπου οι φυσικοχημικές ιδιότητες ή οι βιολογικές επιπτώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν το επιτρέπουν, η υψηλότερη δόση επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικότητα αλλά όχι τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Επιλέγεται σειρά ελαττούμενων δόσεων έτσι ώστε αφενός να καταδειχθεί η σχέση της απόκρισης με τη δόση και αφετέρου η χαμηλότερη δόση να αποτελεί επίπεδο έκθεσης χωρίς τοξική επίδραση (NOAEL). Συχνά, η καλύτερη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ δόσεων και πολλές φορές είναι προτιμότερο να προστεθεί μια τέταρτη ομάδα δοκιμασίας παρά να είναι τα διαστήματα μεταξύ των δόσεων εξαιρετικά μεγάλα (π.χ. με συντελεστή μεγαλύτερο από 6 έως 10).

Οι μάρτυρες είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα προοριζόμενη για τον έλεγχο του εκδόχου, εφόσον χρησιμοποιείται εκδόχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκτός από το ότι δεν τους χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία, κατά τα άλλα οι μάρτυρες υπόκεινται στους ίδιους ακριβώς χειρισμούς με τα ζώα των ομάδων αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται εκδόχο, ο όγκος εκδόχου που χορηγείται στους μάρτυρες είναι ο μεγαλύτερος που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής. Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στην τροφή, και προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής, τότε ίσως είναι χρήσιμη μια επιπλέον ομάδα μαρτύρων υποβαλλόμενη στην ίδια δίαιτα προκειμένου να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της μείωσης για γευστικούς λόγους και της μείωσης λόγω τοξικολογικής επίδρασης στο δοκιμαστικό μοντέλο.

Εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του εκδόχου και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: επιπτώσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στο μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιπτώσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιπτώσεις στην κατανάλωση τροφής ή ύδατος ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

1.4.3.4 Οριακή δοκιμή

Εάν δοκιμή με δόση ισοδύναμη τουλάχιστον με 1000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια, δεν προκαλέσει εμφανείς τοξικές επιπτώσεις, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση τοξικότητας με βάση στοιχεία για ουσίες παρόμοιας δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η οριακή δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεδομένα που αφορούν την έκθεση του ανθρώπου δείχνουν ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη δόση.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 Χορήγηση των δόσεων

Στα ζώα χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία καθημερινά, εφτά ημέρες την εβδομάδα επί 90 ημέρες. Κάθε άλλο καθεστώς χορήγησης, π.χ. πέντε ημέρες την εβδομάδα, πρέπει να αιτιολογείται. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στα ζώα με καθετήρα, χορηγείται σε εφάπαξ δόση με στομαχικό σωλήνα ή με άλλη κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν υπερβαίνει το 1 ml/100g βάρους σώματος, εκτός από τις περιπτώσεις υδατικών διαλυμάτων όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν 2 ml/100g βάρους σώματος. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερες επιπτώσεις σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο πρέπει να ελαχιστοποιούνται με προσαρμογή της συγκέντρωσης ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλες τις δόσεις.

Για τις ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου ύδατος, μεριμνάται ώστε οι απαιτούμενες ποσότητες της υπό δοκιμή ουσίας να μην επηρεάζουν την κανονική διατροφική ή υδατική ισορροπία. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, χρησιμοποιείται είτε η σταθερή συγκέντρωση στην τροφή (ppm) είτε η σταθερή δόση εκφρασμένη επί του βάρους του σώματος του ζώου. Άλλος εναλλακτικός τρόπος, εάν χρησιμοποιηθεί, ορίζεται με λεπτομέρειες. Για ουσίες που χορηγούνται με καθετηρίαση, η χορήγηση γίνεται τις ίδιες περιόδους κάθε ημέρα και οι δόσεις προσαρμόζονται ώστε η δόση σε αναλογία με το βάρος σώματος του ζώου να διατηρείται σταθερή. Όταν η μελέτη 90 ημερών διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρονίας τοξικότητας, χρησιμοποιείται και στις δύο μελέτες παρόμοια δίαιτα.

1.5.2

Παρατηρήσεις

Η ελάχιστη περίοδος παρατήρησης είναι 90 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που έχουν προβλεφθεί για μετέπειτα παρατήρηση κρατούνται για ορισμένο χρόνο χωρίς αγωγή για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις παραμένουν ή έχουν εκλείψει.

Τα ζώα υποβάλλονται σε γενική κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την ίδια ώρα, με συνεκτίμηση του σημείου αιχμής των επιπτώσεων που αναμένονται μετά τη χορήγηση της δόσης. Καταγράφεται η κλινική κατάσταση των ζώων. Τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα, συνήθως στην αρχή και στο τέλος κάθε ημέρας, όλα τα ζώα εξετάζονται για σημεία νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Τουλάχιστον μία φορά πριν την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση κάθε πειραματόζωου με την προ της δοκιμής κατάστασή του), και μία φορά την εβδομάδα στη συνέχεια, εκτελείται λεπτομερής κλινική παρατήρηση όλων των ζώων. Οι παρατηρήσεις γίνονται εκτός των κλωβών, κατά προτίμηση στο ίδιο πάντα μέρος και την ίδια περίπου ώρα κάθε φορά. Καταγράφονται προσεκτικά, κατά προτίμηση με βάση κάποιο σύστημα βαθμολόγησης, που έχει οριστεί από το εργαστήριο. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Τα συμπτώματα που καταγράφονται περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, εμφάνιση εκκρίσεων και απεκρίσεων και αυτόνομης δραστηριότητας (π.χ. δακρύρροια, όρθωση τριχών, μέγεθος οφθαλμικής κόρης, ασύννηθη αναπνοή). Τυχόν μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος ή στην ανταπόκριση στο χειρισμό καθώς και εμφάνιση κλονικών ή τονικών κινήσεων, στερεοτυπίας (π.χ. υπερβολική αυτοπεριποίηση, επαναλαμβανόμενη κυκλική βόδιση) ή παράξενης συμπεριφοράς (π.χ. αυτοακρωτηριασμός, οπισθοβόδιση) καταγράφονται επίσης(1).

Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, διενεργείται πριν από τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας και στο τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, εξετάζονται όλα τα ζώα.

Κατά το τέλος της περιόδου έκθεσης και οπωσδήποτε όχι πριν την 11η εβδομάδα, εκτελείται αξιολόγηση της αισθητηριακής ανταπόκρισης σε διαφορετικών ειδών ερεθίσματα (1) (π.χ. ακουστικά, οπτικά και ιδιοδεκτικά ερεθίσματα) (2), (3), (4), αξιολόγηση της δύναμης λαβής (5) και αξιολόγηση της μυϊκής δραστηριότητας (6). Λεπτομερέστερη περιγραφή των διαδικασιών που μπορούν να ακολουθηθούν δίνονται στις αντίστοιχες βιβλιογραφικές παραπομπές. Εναλλακτικές διαδικασίες, διαφορετικές από τις περιγραφόμενες στις βιβλιογραφικές παραπομπές, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης.

Είναι δυνατόν να παραλειφθούν οι παρατηρήσεις για λειτουργικές διαταραχές, οι οποίες εκτελούνται κατά το τέλος της μελέτης όταν υπάρχουν διαθέσιμα σχετικά δεδομένα από άλλες μελέτες και δεν έχουν διαπιστωθεί λειτουργικές ανωμαλίες κατά τις καθημερινές κλινικές παρατηρήσεις.

Κατ'εξάφραση, τέτοιες παρατηρήσεις μπορούν επίσης να παραλειφθούν για τις ομάδες οι οποίες εμφανίζουν σημεία τοξικότητας τέτοιας έντασης ώστε να επηρεάζεται σημαντικά η εκτέλεση της λειτουργικής δοκιμασίας.

1.5.2.1

Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/ύδατος

Τα ζώα ζυγίζονται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση τροφής μετρείται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση. Εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό, η κατανάλωση ύδατος επίσης μετρείται σε εβδομαδιαία τουλάχιστον βάση. Η κατανάλωση ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες με χορήγηση της ουσίας στην τροφή ή με καθετηρίαση κατά τις οποίες η δραστηριότητα πόσης μπορεί να μεταβληθεί.

1.5.2.2 *Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία*

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο και αποθηκεύονται, κατά περίπτωση, υπό κατάλληλες συνθήκες. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής, τα δείγματα συλλέγονται αμέσως πριν τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής.

Στο τέλος της περιόδου δοκιμής και αφού έχουν συλλεχθεί τυχόν ενδιάμεσα δείγματα αίματος εκτελούνται οι εξής αιματολογικές εξετάσεις: μέτρηση αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, αριθμού ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, αριθμού αιμοπεταλίων και μέτρηση του χρόνου/δυναμικού πήξης του αίματος.

Κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιπτώσεων στους ιστούς και ειδικότερα για επιπτώσεις στο νεφρό και στο ήπαρ εκτελείται στα δείγματα αίματος που λαμβάνονται από κάθε ζώο ακριβώς πριν τη διαδικασία θανάτωσης ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ζώα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει). Ύψως και για τις αιματολογικές εξετάσεις, για τις κλινικές βιοχημικές δοκιμές εκτελούνται ενδιάμεσες αιματοληψίες. Συνιστάται να παραμένουν νηστικά τα ζώα τη νύχτα που προηγείται της αιματοληψίας.¹ Στο πλάσμα ή στον ορό προσδιορίζονται οπωσδήποτε τα εξής: νάτριο, κάλιο, γλυκόζη, συνολική χοληστερίνη, ουρία, άζωτο ουρίας του αίματος, κρεατινίνη, συνολική πρωτεΐνη και αλβουμίνη και περισσότερο από δύο ένζυμα ενδεικτικά των ηπατοκυτταρικών επιπτώσεων (όπως η αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, η αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η δεσυδρογονάση της σερβιτόλης). Μετρήσεις πρόσθετων ενζύμων (ηπατικής ή άλλης προέλευσης) και οξέων της χολής, οι οποίες μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες υπό ορισμένες συνθήκες, είναι δυνατό να συμπεριληφθούν.

Προαιρετικά, κατά την τελευταία εβδομάδα της μελέτης, μπορούν να εκτελεστούν οι ακόλουθες αναλύσεις ούρων σε δείγματα τα οποία συλλέγονται σε προκαθορισμένο χρόνο: εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνη, γλυκόζη και αίμα/αιματοκύτταρα.

Επιπλέον, εξετάζεται κατά πόσο είναι σκόπιμο να μελετηθούν οι ορολογικοί δείκτες για τις γενικής φύσεως βλάβες που έχουν υποστεί οι ιστοί. Άλλοι προσδιορισμοί που εκτελούνται εάν οι γνωστές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας μπορούν να επηρεάσουν ή υπάρχει η υποψία ότι επηρεάζουν σχετικά μεταβολικά προφίλ, περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό ασβεστίου, φωσφόρου, τριγλυκεριδίων μετά από νηστεία, ειδικών ορμονών, μεθαίμοσφαιρίνης και χολινεστεράσης. Αυτοί οι προσδιορισμοί εκτελούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή κατά περίπτωση.

Γενικά, απαιτείται ευέλικτη προσέγγιση, εξαρτώμενη από τα είδη και την παρατηρούμενη ή/και αναμενόμενη επίπτωση μιας δεδομένης ουσίας.

Εάν τα ιστορικά στοιχεία αναφοράς δεν είναι κατάλληλα, εξετάζεται κατά πόσο χρειάζεται να προσδιοριστούν οι αιματολογικές και κλινικές βιοχημικές μεταβλητές πριν αρχίσει η χορήγηση της ουσίας. Κατά κανόνα, δεν συνιστάται προσδιορισμός αυτών των δεδομένων πριν τη χορήγηση της αγωγής (7).

(1) Για πολλές μετρήσεις στον ορό και στο πλάσμα, ιδίως για τη γλυκόζη, προτιμάται η ολονύκτια νηστεία. Κυριότερος λόγος γι' αυτό είναι ότι η αυξημένη διακύμανση των τιμών, αναπόφευκτη αν τα ζώα δεν υποβληθούν σε νηστεία, θα τείνει να καλύψει λεπτότερες επιπτώσεις και να δυσχεράνει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η ολονύκτια όμως νηστεία μπορεί να επηρεάσει τον γενικό μεταβολισμό των ζώων και, ιδίως στις μελέτες όπου η ουσία χορηγείται στη δίαιτα, μπορεί να διαταράξει την ημερήσια έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία. Όταν επιλέγεται ολονύκτια νηστεία, ο κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός πρέπει να εκτελείται μετά τη διεξαγωγή των λειτουργικών παρατηρήσεων.

1.5.2.3 *Μακροσκοπική νεκροψία*

Ύαλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των φυσικών στομιών του σώματος καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου αυτών. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, η μήτρα, οι ωοθήκες, ο θύμος, η σπλήνα, ο εγκέφαλος και η καρδιά όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται σε στερεωτικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως υποβληθεί ο εν λόγω ιστός στο μέλλον: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται το άνω τμήμα του εγκεφάλου, η παρεγκεφαλίδα και ο μυελός/γάφυρα), ο νωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αγγενικός, μεσοθωρακικός και σφυϊκός), η υπόφυση, ο θυρεοειδής, ο παραθυρεοειδής, ο θύμος, ο οισοφάγος, οι σιελογόνοι αδένες, ο στόμαχος, το λεπτό και το παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των κηλίδων του Peyer), το ήπαρ, το πάγκρεας, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, η σπλήνα, η καρδιά, η τραχεία και οι πνεύμονες (για να διατηρηθούν κατ' αρχάς διογκώνονται με το στερεωτικό και κατόπιν βυθίζονται σε αυτό), η αορτή, οι γονάδες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο μαστικός αδένας θήλεος, ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη, η χοληδόχος κύστη, οι λεμφαδένες (κατά προτίμηση ένας λεμφαδένας που καλύπτει την οδό χορήγησης και ένας άλλος, απομακρυσμένος ως προς την οδό χορήγησης, ο οποίος καλύπτει τις επιπτώσεις στη συστηματική κυκλοφορία), το περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση κοντά στον μυ, τμήμα του μυελού οστού (ή/και νωπός μυελός οστού λαμβανόμενος με αναρρόφηση), δέρμα και οφθαλμοί (εάν έχουν παρατηρηθεί αλλαγές κατά τις οφθαλμολογικές εξετάσεις). Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι θα πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί. Διατηρούνται επίσης και όλα τα όργανα τα οποία, με βάση τις ήδη γνωστές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας, ενδέχεται να αποτελούν όργανα στόχους.

1.5.2.4 *Ιστοπαθολογία*

Διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση στα διατηρημένα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες των μαρτύρων και στις ομάδες υψηλής δόσης. Οι εν λόγω εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων όλων των άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλαγές σχετιζόμενες με την αγωγή.

Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες.

Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιπτώσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για κάθε ζώο παρέχονται αναλυτικά στοιχεία. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφανίζονται, για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους και ο χρόνος θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός αυτών που εμφάνισαν τοξικότητα, περιγραφή των συμπτωμάτων τοξικότητας (χρόνος εμφάνισης, διάρκεια και σοβαρότητα των τοξικών επιπτώσεων), αριθμός ζώων που εμφανίζουν βλάβες, τι είδους βλάβες και ποσοστό ζώων που εμφανίζουν κάθε είδους βλάβη.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλη και γενικός αποδεκτή στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

2.2 ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1 Υπό δοκιμή ουσία:

- φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά
- αναγνωριστικά στοιχεία
- έκδοχο (όπου απαιτείται): αιτιολόγηση της επιλογής του εκδόχου, όταν δεν είναι το νερό.

2.2.2 Είδος πειραματόζωου

- χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή
- αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων
- προέλευση, συνθήκες στέγασης, διαίτα, κλπ.
- βάρος κάθε ζώου στην αρχή της δοκιμασίας.

2.2.3 Συνθήκες δοκιμής:

- σκεπτικό επιλογής των δόσεων
- λεπτομέρειες σχηματισμού της υπό δοκιμή ουσίας/της προετοιμασίας της τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομογένεια του παρασκευάσματος
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας
- πραγματικές δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό στην πραγματική δόση, εφόσον συντρέχει περίπτωση
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

2.2.4 Αποτελέσματα:

- βάρος σώματος και αλλαγές βάρους σώματος
- κατανάλωση τροφής και κατανάλωση ύδατος, εφόσον εφαρμόζεται
- δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο, συμπεριλαμβανόμενων ενδείξεων τοξικότητας
- φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (είτε είναι αναστρέψιμες είτε όχι)
- αποτελέσματα οφθαλμολογικής εξέτασης
- αξιολόγηση αισθητηριακής δραστηριότητας, δύναμης λαβής και κινητικής δραστηριότητας (όταν υπάρχουν)
- αιματολογικές δοκιμασίες με σχετικές τιμές αναφοράς
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις με σχετικές τιμές αναφοράς
- τελικό βάρος σώματος, βάρος οργάνων και λόγος βάρους οργάνων/βάρος σώματος
- ευρήματα νεκροψίας
- λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων
- στοιχεία απορρόφησης εάν είναι διαθέσιμα
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. ΔΟΚΙΜΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΜΕ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ ΣΕ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η περιγραφόμενη μέθοδος δοκιμής της υποχρόνιας τοξικότητας ουσιών λαμβανόμενων από το στόμα αποτελεί αντιγραφή της μεθόδου TG 409 (1998) του ΟΟΣΑ.

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών μιας ουσίας, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η υποχρόνια τοξικότητα της ουσίας λαμβανόμενης από το στόμα με επαναλαμβανόμενες δόσεις αφού πρώτα έχουν ληφθεί αρχικές πληροφορίες όσον αφορά την τοξικότητα της ουσίας με δοκιμασίες οξείας τοξικότητας ή τοξικότητας επαναλαμβανόμενης δόσης 28 ημερών. Με τη μελέτη 90 ημερών λαμβάνονται πληροφορίες για πιθανούς κινδύνους για την υγεία οι οποίοι ενδεχομένως προκύψουν λόγω επαναλαμβανόμενης έκθεσης κατά το χρονικό διάστημα ταχείας ανάπτυξης και έως την αρχή της ενηλικίωσης. Από τη μελέτη θα προκύψουν στοιχεία για τις κύριες τοξικές επιπτώσεις καθώς και ενδείξεις για τα όργανα-στόχους και για την πιθανότητα συσσώρευσης-μπορεί επίσης να προκύψει εκτίμηση για ένα επίπεδο έκθεσης στο οποίο δεν παρατηρείται τοξική επίπτωση (no-observed-adverse-effect level) και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή των δόσεων για χρόνιες μελέτες και για τη θέσπιση κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση του ανθρώπου.

Η μέθοδος δοκιμής επιτρέπει τον προσδιορισμό σε μη τροφτικά των παρενεργειών από την έκθεση σε χημικές ουσίες και πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο:

- όταν οι παρατηρούμενες σε άλλες μελέτες επιπτώσεις υποδεικνύουν την ανάγκη για διασάφηση/χαρακτηρισμό σε ένα δεύτερο είδος, μη τροφτικό, ή
- όταν μελέτες τοξικοκινητικότητας δείχνουν ότι η χρήση ενός ειδικού είδους το οποίο δεν ανήκει στα τροφτικά, είναι η καταλληλότερη επιλογή εργαστηριακού ζώου, ή
- όταν άλλοι ειδικοί λόγοι αιτιολογούν τη χρήση μη τροφτικού είδους.

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρος Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Δόση: είναι η χορηγούμενη ποσότητα δοκιμαζόμενης ουσίας. Η δόση εκφράζεται σε βάρος (g, mg) ή σε βάρος δοκιμαζόμενης ουσίας ανά μονάδα βάρους πειραματόζωου (π.χ.mg/kg), ή σε σταθερές συγκεντρώσεις στη διαίτα (ppm).

Δοσολογία: είναι ένας γενικός όρος που περιλαμβάνει τη δόση, τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

NOAEL: πρόκειται για συντομογραφία του "no-observed-adverse-effect level" και είναι η υψηλότερη δόση στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις σχετιζόμενες με την αγωγή.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα ημερησίως σε σταδιακά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση (ένα επίπεδο συγκέντρωσης) ανά ομάδα για χρονικό διάστημα 90 ημερών. Κατά την περίοδο χορήγησης της αγωγής, τα ζώα παρατηρούνται εντατικά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας υποβάλλονται σε νεκροψία και, στο τέλος της δοκιμασίας, τα επιζήσαντα ζώα θανατώνονται και επίσης υποβάλλονται σε νεκροψία.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1 Επιλογή είδους πειραματόζωου

Το συνήθως χρησιμοποιούμενο είδος μη τροκτικού πειραματόζωου είναι ο σκύλος, και πρέπει να είναι καθορισμένης ποικιλίας συχνά χρησιμοποιείται το αγγλέζικο λαγωνικό (beagle). Άλλα είδη όπως ο χοίρος και τα χοιρίδια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν. Η χρήση πρωτευόντων θηλαστικών δεν συνιστάται και θα πρέπει να αιτιολογείται. Χρησιμοποιούνται νεαρά υγιή ζώα και στην περίπτωση του σκύλου η αγωγή ξεκινά κατά προτίμηση στην ηλικία των 4-6 μηνών και όχι αργότερα από την ηλικία των 9 μηνών. Όταν η μελέτη διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας πρέπει και στις δύο μελέτες να χρησιμοποιηθούν το ίδιο είδος και ποικιλία.

1.4.2 Προετοιμασία των ζώων

Χρησιμοποιούνται νεαρά υγιή ζώα, τα οποία έχουν εγκλιματισθεί στις εργαστηριακές συνθήκες και δεν έχουν υποβληθεί σε προηγούμενους πειραματικούς χειρισμούς. Η διάρκεια εγκλιματισμού εξαρτάται από το είδος και την προέλευσή του. Συνιστάται χρόνος τουλάχιστον 5 ημερών για σκύλους ή χοίρους που έχουν ανατραφεί για το σκοπό αυτό σε μόνιμη αποικία και τουλάχιστον 2 εβδομάδων για τα ζώα εξωτερικής προέλευσης. Τα πειραματόζωα χαρακτηρίζονται με βάση το είδος, την ποικιλία, την προέλευση, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία. Τα πειραματόζωα κατανέμονται με τυχαία επιλογή σε ομάδες αγωγής και ομάδες μαρτύρων. Οι κλωβοί διατάσσονται με τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις οφειλόμενες στη θέση των κλωβών. Σε κάθε ζώο αποδίδεται ένας μοναδικός αναγνωριστικός αριθμός.

1.4.3 Παρασκευή των δόσεων

Οι υπό δοκιμή ουσίες μπορεί να χορηγούνται μέσα στην τροφή ή στο πόσιμο νερό, με στομαχική καθετήρεια ή σε κάψουλες. Η μέθοδος χορήγησης από το στόμα εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού της δοκιμής.

Όταν χρειάζεται, δημιουργείται διάλυμα ή εναιώρημα της δοκιμαζόμενης ουσίας σε κατάλληλο έκδοχο. Συνιστάται, όταν είναι εφικτό, να εξετάζεται πρώτα η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί υδατικό διάλυμα/εναιώρημα, κατόπιν διάλυμα/γαλάκτωμα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο) και τέλος η διάλυση σε άλλα έκδοχα. Πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά των άλλων (πλην του ύδατος) εκδόχων. Πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας στις συνθήκες χορήγησης.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 Αριθμός και ηλικία των ζώων

Για κάθε δόση χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 8 ζώα (τέσσερα θηλυκά και τέσσερα αρσενικά). Εάν προβλέπονται θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός αυξάνεται ανάλογα κατά τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν την ολοκλήρωση της μελέτης. Ο αριθμός ζώων με την ολοκλήρωση της μελέτης πρέπει να είναι επαρκής για ουσιαστική αξιολόγηση των τοξικών επιπτώσεων. Με βάση όσα είναι ήδη γνωστά για τη χημική ουσία ή άλλη ουσία ανάλογη αυτής, πρέπει να εξετάζεται η περίπτωση να περιληφθεί πρόσθετη δορυφορική ομάδα 8 ζώων (τεσσάρων ανά φύλο), στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα της υψηλότερης δόσης για να διαπιστωθεί κατά πόσον οι τοξικές επιπτώσεις εμμένουν ή αναστρέφονται μετά την περίοδο της αγωγής. Η διάρκεια της μετά την αγωγή περιόδου καθορίζεται με κατάλληλο τρόπο, ανάλογα με τις επιπτώσεις που θα παρατηρηθούν.

1.5.2 Δοσολογία

Χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον διαφορετικές δόσεις και ταυτόχρονα ένας μάρτυρας, εκτός από τις περιπτώσεις οριακής δοκιμής (βλέπε 1.5.3). Η επιλογή των δόσεων μπορεί να βασιστεί στα αποτελέσματα μελετών επαναλαμβανόμενης δόσης ή εντοπισμού εύρους τιμών και πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα διαθέσιμα τοξικολογικά και τοξικοκινητικά δεδομένα που αφορούν τη δοκιμαζόμενη ουσία ή συναφείς ουσίες. Εκτός από τις περιπτώσεις όπου οι φυσικοχημικές ιδιότητες ή οι βιολογικές επιπτώσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν το επιτρέπουν, η υψηλότερη δόση επιλέγεται με σκοπό να επιφέρει τοξικότητα αλλά όχι τον θάνατο ή έντονη οδύνη. Επιλέγεται σειρά ελαττούμενων δόσεων με τρόπο ώστε αφενός να καταδειχθεί η σχέση της απόκρισης με τη δόση και αφετέρου η χαμηλότερη δόση να αποτελεί επίπεδο έκθεσης χωρίς τοξική επίδραση (NOAEL). Συχνά, η καλύτερη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων δόσεων είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ δόσεων και πολλές φορές είναι προτιμότερο να προστεθεί μία τέταρτη ομάδα δοκιμασίας παρά να είναι τα διαστήματα μεταξύ των δόσεων εξαιρετικά μεγάλα (π.χ. με συντελεστή μεγαλύτερο από 6 έως 10).

Η ομάδα των μαρτύρων είναι ομάδα μη υποβαλλόμενη σε αγωγή ή ομάδα ελέγχου του εκδόχου όταν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εκτός από το ότι δεν τους χορηγείται η υπό δοκιμή ουσία, κατά τα άλλα οι μάρτυρες υπόκεινται στους ίδιους ακριβώς χειρισμούς με τα ζώα των ομάδων αγωγής. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο, οι μάρτυρες λαμβάνουν το έκδοχο στον μέγιστο όγκο από αυτούς που χρησιμοποιούνται στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή. Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται στην τροφή, και προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής, τότε ίσως είναι χρήσιμη μια ομάδα μαρτύρων που υποβάλλεται στην ίδια διατροφή προκειμένου να γίνει διαχωρισμός μεταξύ της μείωσης για γαστρικούς λόγους και της μείωσης λόγω τοξικής επίπτωσης στο δοκιμαστικό μοντέλο.

Πρέπει να εξετάζονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του εκδόχου και άλλων προσθέτων, όπου χρησιμοποιούνται: επιπτώσεις στην απορρόφηση, στην κατανομή, στο μεταβολισμό ή στην κατακράτηση της υπό δοκιμή ουσίας, επιπτώσεις στις χημικές ιδιότητες της υπό δοκιμή ουσίας οι οποίες μπορούν να μεταβάλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά αυτής και επιπτώσεις στην κατανάλωση τροφής ή ύδατος ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

1.5.3 Οριακή δοκιμή

Εάν δοκιμή με δόση ισοδύναμη τουλάχιστον με 1000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη συνέχεια, δεν προκαλέσει εμφανείς τοξικές επιπτώσεις, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση τοξικότητας με βάση στοιχεία για ουσίες παρόμοιας δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρεις διαφορετικές δόσεις. Η οριακή δοκιμή δεν εφαρμόζεται σε περιπτώσεις κατά τις οποίες δεδομένα που αφορούν την έκθεση του ανθρώπου δείχνουν ότι είναι αναγκαίο να χρησιμοποιηθεί υψηλότερη δόση.

1.5.4 Χορήγηση των δόσεων

Στα ζώα χορηγείται η δοκιμαζόμενη ουσία καθημερινά, επτά ημέρες την εβδομάδα επί 90 ημέρες. Κάθε άλλο καθεστώς χορήγησης, π.χ. πέντε ημέρες την εβδομάδα, πρέπει να αιτιολογείται. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στα ζώα με καθετήρα, χορηγείται σε εφάπαξ δόση με στομαχικό σωλήνα ή με άλλη κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Συνήθως ο όγκος πρέπει να παραμένει ο μικρότερος δυνατός. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο ελαχιστοποιούνται με προσαρμογή της συγκέντρωσης ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλες τις δόσεις.

Για τις ουσίες που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου ύδατος, μεριμνάτε ώστε οι απαιτούμενες ποσότητες της υπό δοκιμή ουσίας να μην επηρεάζουν την κανονική διατροφική ή υδατική ισορροπία. Όταν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται με την τροφή, χρησιμοποιείται είτε η σταθερή συγκέντρωση στην διατροφή (ppm) είτε η σταθερή δόση εκφρασμένη επί του βάρους του σώματος του ζώου. Εάν χρησιμοποιηθεί άλλος εναλλακτικός τρόπος, ορίζεται με λεπτομέρειες. Για ουσίες που χορηγούνται με καθετήρα ή με κάουλα, η χορήγηση γίνεται τις ίδιες περίπου ώρες κάθε μέρα και οι δόσεις προσαρμόζονται ώστε η δόση σε αναλογία με το βάρος σώματος του ζώου να διατηρείται σταθερή. Όταν η μελέτη 90 ημερών διενεργείται ως προκαταρκτική μελέτη για μακρόχρονη μελέτη χρόνιας τοξικότητας, χρησιμοποιείται και στις δύο μελέτες παρόμοια διατροφή.

1.5.5 Παρατηρήσεις

Η ελάχιστη περίοδος παρατήρησης είναι 90 ημέρες. Τα ζώα των δορυφορικών ομάδων που έχουν προβλεφθεί για παρατηρήσεις των επακόλουθων επιπτώσεων διατηρούνται για κατάλληλο χρονικό διάστημα χωρίς αγωγή, ώστε να εξακριβωθεί η ανάρρωση από τις τοξικές επιπτώσεις ή η εμμονή τους.

Τα ζώα υποβάλλονται σε γενική κλινική παρατήρηση τουλάχιστον μία φορά την ημέρα, κατά προτίμηση την ίδια ώρα, με συνεκτίμηση του σημείου αιχμής των συμπτωμάτων που αναμένονται μετά τη χορήγηση της δόσης. Καταγράφεται η κλινική κατάσταση των ζώων. Τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα, συνήθως στην αρχή και στο τέλος κάθε μέρας, όλα τα ζώα εξετάζονται για σημεία νοσηρότητας και θνησιμότητας.

Τουλάχιστον μία φορά πριν την πρώτη έκθεση (ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση κάθε πειραματόζωου με την προ της δοκιμής κατάστασή του), και μία φορά την εβδομάδα στη συνέχεια, εκτελείται λεπτομερής κλινική παρατήρηση όλων των ζώων. Οι παρατηρήσεις γίνονται εκτός των κλωβών, κατά προτίμηση στο ίδιο πάντα μέρος και την ίδια περίπου ώρα κάθε φορά. Καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να είναι ελάχιστες οι διαφορές στις συνθήκες παρατήρησης. Καταγράφονται προσεκτικά τα συμπτώματα τοξικότητας, ο χρόνος έναρξης, ο βαθμός και η διάρκειά τους. Τα συμπτώματα που καταγράφονται πρέπει να περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, εμφάνιση εκκρίσεων και απεκκρίσεων και αυτόνομης δραστηριότητας (π.χ.δακρύρροια, όρθωση τριχών, μέγεθος οφθαλμικής κόρης, ασυνήθης αναπνοή). Τυχόν μεταβολές στο βάδισμα, στη στάση του σώματος ή στην ανταπόκριση στο χειρισμό καθώς και εμφάνιση κλονικών (κινήσεις με τη μορφή νευρικού τίκ) ή τονικών κινήσεων, στερεοτυπίας (π.χ. υπερβολική αυτοπεριποίηση, επαναλαμβανόμενη κυκλική βάδιση) ή παράξενης συμπεριφοράς καταγράφονται επίσης.

Η οφθαλμολογική εξέταση, με χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, διενεργείται πριν από τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας και στο τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες των μαρτύρων. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, εξετάζονται όλα τα ζώα.

1.5.5.1 Βάρος σώματος και κατανάλωση τροφής/ύδατος

Τα ζώα ζυγίζονται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση τροφής μετρείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Εάν η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό, η κατανάλωση ύδατος επίσης μετρείται τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα. Η κατανάλωση ύδατος πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη στις μελέτες με χορήγηση της ουσίας στην τροφή ή με στομαχικό καθετηριασμό κατά τις οποίες μπορεί να σημειωθούν μεταβολές στην πόση.

1.5.5.2 Αιματολογικές εξετάσεις και κλινική βιοχημεία

Τα δείγματα αίματος λαμβάνονται από ένα συγκεκριμένο σημείο και αποθηκεύονται, κατά περίπτωση, υπό κατάλληλες συνθήκες. Στο τέλος της περιόδου δοκιμής, τα δείγματα συλλέγονται αμέσως πριν τη διαδικασία θανάτωσης των ζώων ή στο πλαίσιο της διαδικασίας αυτής.

Αιματολογικές εξετάσεις που περιλαμβάνουν τουλάχιστον μετρήσεις αιματοκρίτη, συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, αιμοπεταλίων καθώς και μετρήσεις της πηκτικότητας του αίματος όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης ή θρομβοπλαστίνης πρέπει να εκτελούνται στην αρχή της μελέτης, κατόπιν ανά μήνα ή στο μέσο της μελέτης και τέλος όταν η μελέτη ολοκληρωθεί.

Εκτελούνται κλινικοί βιοχημικοί προσδιορισμοί για τη διερεύνηση κύριων τοξικών επιπτώσεων στους ιστούς και, ειδικότερα, στο νεφρό και στο ήπαρ στα δείγματα αίματος που λαμβάνονται από κάθε ζώο στην αρχή της μελέτης, κατόπιν ανά μήνα ή στο μέσο της μελέτης και τέλος όταν λήξει το χρονικό διάστημα της μελέτης. Εξετάζονται τα εξής: ηλεκτρολυτική ισορροπία, μεταβολισμός υδρογονανθράκων και νεφρική και ηπατική λειτουργία. Η επιλογή των συγκεκριμένων δοκιμασιών εξαρτάται από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο δράσης της υπό δοκιμή ουσίας. Πριν την αιματοληψία, τα ζώα υποβάλλονται σε νηστεία για διάστημα ανάλογο με το είδος. Προτείνεται να προσδιορίζονται: ασβέστιο, φώσφορος, χλώριο, νάτριο, κάλιο, γλυκόζη μετά από νηστεία, αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης, γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση, άζωτο ουρίας, αλβουμίνη, κρεατινίνη αίματος, ολική χολερυθρίνη και ολικές πρωτεΐνες ορού.

Αναλύσεις ούρων εκτελούνται τουλάχιστον στην αρχή, στο μέσο και στο τέλος της μελέτης με δείγματα ούρων τα οποία συλλέγονται σε προκαθορισμένο χρόνο: Με τις αναλύσεις ούρων προσδιορίζονται τα εξής: εμφάνιση, όγκος, οσμωτική ικανότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνη, γλυκόζη και αίμα/αιματοκύτταρα. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν και πρόσθετες παράμετροι όπου απαιτείται για την επέκταση της έρευνας των επιπτώσεων που παρατηρήθηκαν.

Επιπλέον, εξετάζεται η σκοπιμότητα να μελετηθούν οι ορολογικοί δείκτες για τις γενικής φύσεως βλάβες που έχουν υποστεί οι ιστοί. Άλλοι προσδιορισμοί, οι οποίοι μπορεί να είναι αναγκαίοι για την τοξικολογική αξιολόγηση, περιλαμβάνουν: ανάλυση λιπιδίων, ορμονών, ισορροπία οξέων/βάσεων, μεθαμοσφαιρίνης και αναστολής χολινεστεράσης. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθούν και άλλοι κλινικοί βιοχημικοί προσδιορισμοί για την επέκταση της έρευνας των παρατηρηθεισών επιπτώσεων. Αυτοί οι προσδιορισμοί εκτελούνται για χημικές ουσίες ορισμένων κατηγοριών ή κατά περίπτωση.

Γενικά, απαιτείται ευέλικτη προσέγγιση, εξαρτώμενη από τα είδη και την παρατηρούμενη ή/και αναμενόμενη επίπτωση μιας δεδομένης ουσίας.

1.5.5.3 *Μακροσκοπική νεκροψία*

Όλα τα ζώα της μελέτης υποβάλλονται σε πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει προσεκτική εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των φυσικών στομιών του σώματος καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ με τη χοληδόχο κύστη, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, οι όρχεις, οι επιδιδυμίδες, οι ωοθήκες, η μήτρα, ο θυροειδής (με τους παραθυροειδείς), ο θύμος, η σπλήνα, ο εγκέφαλος και η καρδιά όλων των ζώων (εξαιρούνται τα ετοιμοθάνατα ή/και όσα έχουν στο μεταξύ πεθάνει) καθαρίζονται από τυχόν άλλους προσκολλημένους ιστούς, όπως ενδείκνυται, και ζυγίζονται υγρά αμέσως μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση.

Οι ακόλουθοι ιστοί διατηρούνται σε στερεωτικό μέσο κατάλληλο και για τον τύπο ιστού και για το είδος ιστοπαθολογικής εξέτασης στο οποίο ενδεχομένως υποβληθεί ο εν λόγω ιστός στο μέλλον: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος (αντιπροσωπευτικές περιοχές στις οποίες περιλαμβάνονται το άνω τμήμα του εγκεφάλου, η παρεγκεφαλίδα και ο μυελός/γέφυρα), ο ωτιαίος μυελός (σε τρία επίπεδα: αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), η υπόφυση, τα μάτια, ο θυροειδής, ο παραθυροειδής, ο θύμος, ο οισοφάγος, οι σιελογόνοι αδένες, ο στόμαχος, το λεπτό και το παχύ έντερο (συμπεριλαμβανομένων των κηλίδων του Peyer), το ήπαρ, η χοληδόχος κύστη, το πάγκρεας, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, η σπλήνα, η καρδιά, η τραχεία και οι πνεύμονες, η αορτή, οι γονάδες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο θηλαστικός αδένας θήλεος, ο προστάτης, η ουροδόχος κύστη, η χοληδόχος κύστη, οι λεμφαδένες (κατά προτίμηση ένας λεμφαδένας που καλύπτει την οδό χορήγησης και ένας άλλος, απομακρυσμένος ως προς την οδό χορήγησης, ο οποίος καλύπτει τις επιπτώσεις στο σωματικό σύστημα), το περιφερειακό νεύρο (ισχιακό ή κνημιαίο) κατά προτίμηση κοντά στον μυ, τμήμα του μυελού οστού (ή/και νωπός μυελός οστού λαμβανόμενος με αναρρόφηση) και το δέρμα. Κλινικά και άλλα ευρήματα ενδεχομένως υποδεικνύουν ότι θα πρέπει να εξεταστούν και άλλοι πρόσθετοι ιστοί. Διατηρούνται επίσης και όλα τα όργανα τα οποία, με βάση τις ήδη γνωστές ιδιότητες της δοκιμαζόμενης ουσίας, ενδέχεται να αποτελούν όργανα στόχους.

1.5.5.4 Ιστοπαθολογία

Διεξάγεται πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση στα όργανα και στους ιστούς (που έχουν διατηρηθεί) όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες των μαρτύρων και στις ομάδες υψηλής δόσης. Οι εξετάσεις επεκτείνονται στα ζώα των ομάδων άλλων δόσεων εάν στην ομάδα υψηλής δόσης έχουν παρατηρηθεί αλλαγές σχετιζόμενες με την αγωγή.

Εξετάζονται όλες οι μακροσκοπικές βλάβες.

Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, εκτελείται ιστοπαθολογική εξέταση στους ιστούς και στα όργανα τα οποία έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν επιπτώσεις στις ομάδες που υποβάλλονται σε αγωγή.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΕΚΘΕΣΕΙΣ

2.1 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Για κάθε ζώο παρέχονται αναλυτικά στοιχεία. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα καταγράφονται συνοπτικά σε πίνακες, όπου εμφανίζονται, για κάθε ομάδα δοκιμής ο αριθμός των ζώων στην αρχή της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή θανατώθηκαν για ανθρωπιστικούς λόγους και ο χρόνος θανάτου ή θανάτωσης, ο αριθμός αυτών που εμφάνισαν τοξικότητα, περιγραφή των συμπτωμάτων τοξικότητας (χρόνος εμφάνισης, διάρκεια και σοβαρότητα των τοξικών επιπτώσεων, αριθμός των ζώων που εμφανίζουν βλάβες, τι είδους βλάβες και ποσοστό ζώων που εμφανίζουν κάθε είδους βλάβη).

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλη και γενικώς αποδεκτή στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι και τα προς ανάλυση δεδομένα επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

2.2 ΕΚΘΕΣΗ

Η έκθεση με τα αποτελέσματα της δοκιμασίας πρέπει να περιέχει τις ακόλουθες πληροφορίες:

2.2.1 Υπό δοκιμή ουσία:

- φυσική μορφή, καθαρότητα και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά
- αναγνωριστικά στοιχεία
- έκδοχο (όπου απαιτείται): αιτιολόγηση της επιλογής του εκδόχου, όταν δεν είναι το νερό.

2.2.2 Είδος πειραματόζωου

- χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή·
- αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων·
- πηγή προέλευσης, συνθήκες στέγασης, διαίτα, κλπ·
- βάρος κάθε ζώου στην αρχή της δοκιμασίας.

2.2.3 Συνθήκες δοκιμής:

- σκεπτικό επιλογής των δόσεων·
- λεπτομέρειες σχηματισμού της υπό δοκιμή ουσίας/της προετοιμασίας της τροφής, επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομογένεια του παρασκευάσματος·
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας·
- ακριβείς δόσεις (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα) και συντελεστής μετατροπής της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στην τροφή ή στο πόσιμο νερό στην πραγματικά λαμβανόμενη δόση, εφόσον συντρέχει περίπτωση·
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού.

2.2.4 **Αποτελέσματα:**

- βάρος σώματος και αλλαγές βάρους σώματος·
- κατανάλωση τροφής και κατανάλωση ύδατος, κατά περίπτωση·
- δεδομένα τοξικών αποκρίσεων ανά δόση και φύλο, συμπεριλαμβανόμενων ενδείξεων τοξικότητας·
- φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (είτε είναι αναστρέψιμες είτε όχι)·
- οφθαλμολογική εξέταση·
- αιματολογικές δοκιμασίες με σχετικές τιμές αναφοράς·
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις με σχετικές τιμές αναφοράς·
- τελικό βάρος σώματος, βάρος οργάνων και λόγος βάρους οργάνων/βάρος σώματος·
- ευρήματα νεκροψίας·
- λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων·
- στοιχεία απορρόφησης εάν είναι διαθέσιμα·
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όταν αυτό είναι δυνατό.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα

B. 28

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΔΕΡΜΑΤΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ

ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ 90 ΗΜΕΡΩΝ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΑΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου του πειράματος

Η δοκιμαζόμενη ουσία τίθεται καθημερινά πάνω στο δέρμα σε προδευτικά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες πειραματόζωων, μία δόση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών. Κατά την περίοδο της αγωγής τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια του πειράματος, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος του πειράματος, υφίστανται νεκροψία.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου του πειράματος

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Λίγο πριν από τη δοκιμασία το τρίχωμα απομακρύνεται με κούρεμα από τη νοτιαία περιοχή του κορμού των πειραματόζωων. Μπορεί επίσης να απομακρυνθεί με ξύρισμα, που πρέπει όμως να γίνει 24 ώρες περίπου πριν από τη δοκιμασία. Επανάληψη του κούρεματος ή ξύρισματος απαιτείται συνήθως κάθε εβδομάδα περίπου. Κατά το κούρεμα ή το ξύρισμα του τριχώματος πρέπει να καταβληθεί προσοχή ώστε να αποφευχθεί ή εκδορά του δέρματος. Δέκα τοις εκατό τουλάχιστον της επιφάνειας του δέρματος πρέπει να είναι γυμνή για την επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας. Το βάρος του ζώου πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη λήψη της απόφασης σχετικά με την περιοχή που θα πρέπει να απογυμνωθεί και για τις διαστάσεις της επικάλυψης. Κατά τη δοκιμασία στερεών ουσιών, που μπορούν, εφόσον είναι δυνατό, να κονιοποιηθούν, η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να υγρανθεί επαρκώς με νερό ή, εφόσον χρειάζεται, με κατάλληλο έκδοχο για να εξασφαλισθεί καλή επαφή με το δέρμα. Οι υγρές δοκιμαζόμενες ουσίες χρησιμοποιούνται συνήθως χωρίς αραιώση. Εφαρμόζεται καθημερινή επίθεση της ουσίας επί πέντε ή επτά ημέρες την εβδομάδα.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο αρουραίος, το κουνέλι ή το ινδικό χοιρίδιο, πλήρους ανάπτυξης. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, αλλά η χρήση τους θα απαιτούσε αιτιολόγηση. Στην αρχή του πειράματος, η διαφορά βάρους δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη δερματικής τοξικότητας, για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και στελέχη.

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) με υγιές δέρμα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε κάθε επίπεδο δόσης. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν σχεδιάζονται ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός θα πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Εκτός αυτού, μία δορυφορική ομάδα 20 ζώων (10 ζώα ανά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το υψηλό επίπεδο δόσης επί 90 ημέρες και να παρατηρείται για αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών επιδράσεων για μεταγενέστερη αγωγή 28 ημερών.

Επίπεδα δόσεων

Απαιτούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και ένας μάρτυρας ή έκδοχο μάρτυρας εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο. Η περίοδος έκθεσης θα πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες τουλάχιστον την ημέρα. Η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας πρέπει να γίνεται σε παραπλήσιες χρονικές στιγμές κάθε ημέρα, και η ποσότητα της επιτιθέμενης ουσίας να προσαρμόζεται κατά διαστήματα (κάθε μία ή δύο εβδομάδες) για τη διατήρηση ενός σταθερού επιπέδου δόσης, με βάση το βάρος του σώματος του ζώου. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας. Σε περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο για να διευκολύνει τη χορήγηση των δόσεων, τα ζώα της ομάδας ελέγχου εκδόχου λαμβάνουν δόσεις κατά τον ίδιο τρόπο όπως οι ομάδες που υφίστανται την αγωγή και λαμβάνουν την ίδια ποσότητα μ' εκείνη που λαμβάνεται από την ομάδα υψηλότερου επιπέδου δόσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλεί τοξικές επιδράσεις όχι όμως και θανάτους ή τουλάχιστον πολύ λίγους. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλεί οποιοδήποτε ίχνος τοξικότητας. Στην περίπτωση που υπάρχει χρησιμοποιήσιμη εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο θα πρέπει να την υπερβεί. Στην ιδανική περίπτωση το ενδιάμεσο επίπεδο δόσης πρέπει να προκαλεί ελάχιστες παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεσες δόσεις, τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Στη χαμηλή και στην ενδιάμεση ομάδα, καθώς και στην ομάδα μάρτυρα, η επέλευση οποιονδήποτε θανάτων πρέπει να είναι χαμηλή έτσι ώστε να επιτρέπει μια ουσιαστική εκτίμηση αποτελεσμάτων.

Εάν η επίθεση της δοκιμαζόμενης ουσίας δημιουργήσει σοβαρό ερεθισμό του δέρματος, οι συγκεντρώσεις πρέπει να ελαττωθούν, και αυτό ίσως να έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση ή την απουσία άλλων τοξικών επιδράσεων στο υψηλό επίπεδο δόσης. Εάν το δέρμα έχει υποστεί σοβαρή βλάβη, πιθανόν να χρειαστεί να τερματιστεί η μελέτη και να επαναληφθεί με χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Οριακή δοκιμασία

Εάν μια προκαταρκτική μελέτη σε επίπεδο δόσης 1000 mg/kg ή σε υψηλότερο επίπεδο δόσης αναφορικά με ενδεχόμενη ανθρώπινη έκθεση, όπου αυτό είναι γνωστό, δεν προκαλεί τοξικές επιδράσεις, η συνέχιση του πειράματος μπορεί να μη θεωρηθεί αναγκαία.

Περίοδος παρατήρησης

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για ενδείξεις τοξικότητας. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

Διαδικασία

Τα ζώα πρέπει να παραμένουν σε χωριστά κλουβιά και το ιδανικό είναι να υποβάλλονται σε αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία επτά ημέρες την εβδομάδα για περίοδο 90 ημερών. Τα ζώα σε οποιαδήποτε δορυφορική ομάδα, που έχει προγραμματιστεί για παραπέρα παρατηρήσεις, πρέπει να διατηρούνται για 28 ημέρες ακόμα χωρίς αγωγή για τη διάγνωση της θεραπείας ή της εμμόνης των τοξικών επιδράσεων. Ο χρόνος έκθεσης πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες την ημέρα.

Η δοκιμαζόμενη ουσία πρέπει να επιτίθεται ομοιόμορφα σε έκταση ίση με το 10% περίπου της συνολικής επιφάνειας του σώματος. Στην περίπτωση οσίων υψηλής τοξικότητας, η καλυπτόμενη επιφάνεια μπορεί να είναι μικρότερη, αλλά θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε όσο το δυνατόν περισσότερη επιφάνεια να καλύπτεται με όσο το δυνατόν λεπτό και ομοιόμορφο στρώμα.

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η δοκιμαζόμενη ουσία διατηρείται σε επαφή με το δέρμα με τη χρήση πορώδους επίδεσμου και λευκοπλάστη που δεν προκαλεί ερεθισμό. Η περιοχή της έκθεσης πρέπει να καλύπτεται ακόμη με κατάλληλο τρόπο για τη συγκράτηση του επίδεσμου και της δοκιμαζόμενης ουσίας και για την εξασφάλιση της μη κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας από τα ζώα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα συγκράτησης για την πρόληψη της κατάποσης της δοκιμαζόμενης ουσίας, αλλά δεν συνιστάται η πλήρης ακινητοποίηση. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης τα κατάλοιπα της δοκιμαζόμενης ουσίας θα πρέπει να απομακρυνθούν, εφόσον είναι δυνατό με τη χρήση νερού ή κάποιας άλλης κατάλληλης μεθόδου καθαρισμού του δέρματος. Όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους.

Οι παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη συμπαθητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής, καθώς και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απώλειας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλόμενη σε αιτίες όπως είναι ο κανibalισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου της μελέτης όλα τα επιζώντα ζώα στις μη δορυφορικές ομάδες αγωγής υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

- a) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομόδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα.

- β) αιματολογική εξέταση, που περιλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της πηκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος πήξης, ο χρόνος προθρομβίνης, ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας
- γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές της δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων πειραμάτων θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο επενέργειας της ουσίας. Προτείνονται προσδιορισμοί του αβεστίου, του φωσφόρου, των χλωριούχων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος του ζώου), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος του ορού, της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξικού οξέος του ορού (†), της αποκαρβοξυλάσης της ορνιθίνης, της γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκόματος, της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χολερυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μία επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβάνουν αναλύσεις των λιπιδίων, των ορμονών, της ισορροπίας οξέος/βάσης, της μεθαιμοσφαιρίνης και της δραστικότητας της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαίο, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων
- δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσεως αλλά μόνον όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Εάν τα βασικά ιστορικά στοιχεία είναι ανεπαρκή, πρέπει να εξετασθεί αν χρειάζεται ο προσδιορισμός των αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών παραμέτρων πριν την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομιών, καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχεις πρέπει να ζυγισθούν γρήγορα το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί θα πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, ο εγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας του εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυροειδής/παραθυροειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί (η τραχεία), οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, η χοληδόχος κύστη (εάν υπάρχει), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μπρών), το περιφερικό νεύρο (οι οφθαλμοί), (το στέρνο με μυελό των οστών), (το μηριαίο οστόν, συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας), (ο ωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυγενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), και (οι εξώφθαλμοι δακρυϊκοί αδένες). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνον εάν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή επικλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

- α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στο μη θγένε δέρμα και στο δέρμα που υπέστη αγωγή, καθώς επίσης και στα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρα και υψηλής δόσης.
- β) Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες πρέπει να εξετασθούν.
- γ) Τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης σε άλλες ομάδες δόσης πρέπει να εξετασθούν.
- δ) Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται αρουραίοι, οι πνεύμονες των ζώων στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης πρέπει να υποστούν ιστοπαθολογική εξέταση για τη διαπίστωση λοίμωξης, γιατί έτσι επιτυγχάνεται μια εύκολη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων. Μπορεί να μην απαιτείται τακτικά πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση των ζώων των ομάδων αυτών, αλλά θα πρέπει πάντοτε να διενεργείται σε όργανα τα οποία παρουσίασαν ίχνη βλάβης στην ομάδα υψηλής δόσης.
- ε) Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διενεργείται σε ιστούς και όργανα τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζουν επιδράσεις στις άλλες ομάδες που υφίστανται την αγωγή.

2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες τον τύπο των βλαβών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

(†) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.

(‡) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση του ασπартικού οξέος του ορού.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας θα πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διαίτα κλπ.,
- συνθήκες δοκιμασίας,
- επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, αν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,
- στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,
- επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις, εφόσον είναι δυνατόν,
- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
- περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,
- χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
- στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,
- οφθαλμολογικά ευρήματα,
- αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),
- ευρήματα νεκροψίας,
- λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΟΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΙΣΠΝΟΗ

ΕΠΙΠΛΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗ ΔΟΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ, 90 ΗΜΕΡΩΝ, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΡΩΚΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Αρκετές ομάδες πειραματοζώων εκτίθενται καθημερινά επί ένα ορισμένο χρονικό διάστημα στη δοκιμαζόμενη ουσία σε προοδευτικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις (μία συγκέντρωση ανά ομάδα για περίοδο 90 ημερών). Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται έκδοχο για να βοηθήσει στην παραγωγή μιας κατάλληλης συγκέντρωσης της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια ομάδα εκδόχου, μάρτυρας. Κατά την περίοδο της αγωγής τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας. Τα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, καθώς επίσης και τα επιζήσαντα ζώα στο τέλος της δοκιμασίας, υφίστανται νεκροψία.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, νεαρά υγιή ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται στις απαιτούμενες ομάδες. Εάν υπάρχει ανάγκη, μπορεί να προστεθεί στη δοκιμαζόμενη ουσία κατάλληλο έκδοχο για να βοηθήσει στην παραγωγή κατάλληλης συγκέντρωσης της ουσίας στην ατμόσφαιρα. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα προσθετικά για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιστορικά στοιχεία εάν χρειασθεί.

*Συνθήκες δοκιμασίας**Πειραματόζωα*

Εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις, το προτιμώμενο είδος είναι ο αρουραίος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται ποικιλίες νέων υγιών ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστήριο. Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που διεξάγεται υποχρόνια μελέτη τοξικότητας ουσιών που λαμβάνονται διά της εισπνοής για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Τουλάχιστον 20 ζώα (10 θηλυκά και 10 αρσενικά) πρέπει να χρησιμοποιηθούν για κάθε ομάδα του πειράματος. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν σχεδιάζονται ενδιάμεσες θανατώσεις, ο αριθμός θα πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης. Εκτός αυτού, μία δορυφορική ομάδα 20 ζώων (10 ζώα ανά φύλο) μπορεί να υποβληθεί σε αγωγή με το υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης επί 90 ημέρες και να παρατηρείται για αναστρεψιμότητα, εμμονή ή καθυστερημένη εμφάνιση των τοξικών αποτελεσμάτων για μετεγενέστερη αγωγή 28 ημερών.

Συγκέντρωση έκθεσης

Απαιτούνται τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις, με μάρτυρα ή μάρτυρα έκδοχο (που να αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του εκδόχου στο υψηλότερο επίπεδο), στην περίπτωση χρησιμοποίησης εκδόχου. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τα ζώα στην ομάδα μάρτυρα πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνα της ομάδας του πειράματος. Το υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης πρέπει να έχει σαν αποτέλεσμα τοξικές επιδράσεις όχι όμως και θανάτους, ή τουλάχιστον πολύ λίγους. Όπου υπάρχει χρησιμοποίηση εκτίμηση ανθρώπινης έκθεσης, το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να την υπερβεί. Στην ιδανική περίπτωση το ενδιάμεσο επίπεδο συγκέντρωσης πρέπει να προκαλεί πολύ μικρές παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις. Εάν χρησιμοποιηθούν περισσότερες από μία ενδιάμεσες συγκεντρώσεις, οι συγκεντρώσεις πρέπει να απέχουν μεταξύ τους έτσι ώστε να προκαλούν μια κλιμάκωση τοξικών επιδράσεων.

Στη χαμηλή και στην ενδιάμεση ομάδα, καθώς και στους μάρτυρες, η συχνότητα οποιοδήποτε θανάτου πρέπει να είναι χαμηλή έτσι ώστε να επιτρέπει μια ουσιαστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Χρόνος έκθεσης

Η διάρκεια της καθημερινής έκθεσης πρέπει να ανέρχεται σε έξι ώρες μετά από εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμου. Άλλοι χρόνοι διάρκειας μπορούν να εφαρμοστούν για την ικανοποίηση ιδιαίτερων απαιτήσεων.

Εξοπλισμός

Τα πειράματα πάνω στα ζώα πρέπει να διενεργούνται μέσα σε συσκευές εισπνοής ικανές να διατηρούν μια δυναμική ροή αέρα δώδεκα τουλάχιστον αλλαγών αέρα ανά ώρα, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται θάλαμος, η σχεδίασή του πρέπει να είναι τέτοια ώστε να ελαχιστοποιεί το συνωστισμό των ζώων δοκιμασίας και να μεγιστοποιεί την έκθεσή τους στην εισπνοή της δοκιμαζόμενης ουσίας. Εάν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας ενός θαλάμου πρέπει να οριστεί ότι ο συνολικός «όγκος» των πειραματόζωνων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του όγκου του δοκιμαστικού θαλάμου. Μπορεί να εφαρμοσθεί η στοματορρινική έκθεση, η έκθεση μόνο της κεφαλής ή η έκθεση ολόκληρου του σώματος σε ατομικούς θαλάμους. Στις δύο πρώτες περιπτώσεις ελαχιστοποιείται η λήψη από άλλες οδούς.

Περίοδος παρατήρησης

Τα πειραματόζωα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά για ενδείξεις τοξικότητας καθ' όλη την περίοδο αγωγής και ανάληψης. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος θανάτου και ο χρόνος εμφάνισης και εξαφάνισης των σημείων τοξικότητας.

Διαδικασία

Τα ζώα εκτίθενται στη δοκιμαζόμενη ουσία καθημερινά, πέντε έως επτά ημέρες την εβδομάδα, για περίοδο 90 ημερών. Τα ζώα σε οποιαδήποτε δορυφορική ομάδα, που έχει προγραμματισθεί για παραπέρα παρατηρήσεις, πρέπει να διατηρούνται για 28 ημέρες ακόμα χωρίς αγωγή για τη διάγνωση της θεραπείας ή της εμμονής των τοξικών επιδράσεων.

Η θερμοκρασία κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας πρέπει να διατηρείται στους 22 ± 3 °C. Στην ιδανική περίπτωση η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται μεταξύ 30 και 70%, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. πειράματα αεροζόλ) τα επίπεδα αυτά μπορεί να μην είναι εφαρμόσιμα. Η τροφή και το νερό θα πρέπει να απομακρύνονται κατά τη διάρκεια της έκθεσης. Πρέπει να χρησιμοποιείται ένα δυναμικό σύστημα εισπνοής με κατάλληλο σύστημα αναλυτικού ελέγχου της συγκέντρωσης. Για τη δημιουργία κατάλληλων συγκεντρώσεων έκθεσης συνιστάται δοκιμαστικό πείραμα. Η ροή του αέρα πρέπει να διευθετείται για να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια των συνθηκών σε όλο το θάλαμο έκθεσης. Το σύστημα πρέπει να εξασφαλίζει την όσο το δυνατόν ταχύτερη επίτευξη σταθερών συνθηκών έκθεσης.

Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις ή έλεγχοι για τα ακόλουθα:

- α) ταχύτητα της ροής του αέρα (συνεχώς)
- β) πραγματική συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας με τη διενέργεια μέτρησης στη ζώνη αναπνοής. Κατά τη διάρκεια της καθημερινής περιόδου έκθεσης η συγκέντρωση δεν θα πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 15\%$ της μέσης τιμής. Παρ' όλα αυτά όμως, στην περίπτωση σκονών και αεροζόλ, το επίπεδο αυτό ελέγχου μπορεί να μην είναι επιτευκτό, και τότε θα πρέπει να γίνει αποδεκτή μία ευρύτερη διακύμανση. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης οι καθημερινές συγκεντρώσεις πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατό σταθερές. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής πρέπει να διενεργείται ανάλυση μεγέθους σωματιδίων για την παρακολούθηση της σταθερότητας των συγκεντρώσεων αεροζόλ. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης η ανάλυση πρέπει να διεξάγεται κάθε φορά που είναι απαραίτητο για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή των αιωρούμενων σωματιδίων.
- γ) θερμοκρασία και υγρασία
- δ) κατά τη διάρκεια της έκθεσης και μετά από αυτή διενεργούνται παρατηρήσεις και καταγράφονται συστηματικά, ενώ τηρούνται ατομικοί φάκελοι για κάθε ζώο. Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται οι ενδείξεις τοξικότητας συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους. Οι παρατηρήσεις «κλειβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (καθώς επίσης και για την κατανάλωση νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό), καθώς και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα. Η

τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την κατά το μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απώλειας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλόμενη σε αιτίες όπως είναι ο κανibalισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Στο τέλος της περιόδου της έκθεσης, όλα τα επίζησαντα ζώα αγωγής υφίστανται νεκροψία. Όταν παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Οι παρακάτω εξετάσεις γίνονται συνήθως για όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων:

- α) οφθαλμολογική εξέταση, με τη χρήση οφθαλμοσκοπίου ή ισοδύναμου κατάλληλου εξοπλισμού, πρέπει να διενεργείται πριν από την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία και κατά το τέλος της μελέτης, κατά προτίμηση σε όλα τα ζώα, τουλάχιστον όμως στις ομάδες υψηλής δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Εάν διαπιστωθούν μεταβολές στους οφθαλμούς, πρέπει να εξετασθούν όλα τα ζώα.
- β) αιματολογική εξέταση, που συμπεριλαμβάνει εξέταση του αιματοκρίτη, της συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης, του ερυθροκυτταρικού τύπου, του συνολικού και διαφορικού λευκοκυτταρικού τύπου, καθώς επίσης και μέτρηση της ηπκτικής ικανότητας, όπως είναι ο χρόνος θρομβοπλαστίνης ή ο αριθμός των αιματοπεταλίων, πρέπει να διενεργείται στο τέλος περιόδου δοκιμασίας.
- γ) κλινικός βιοχημικός προσδιορισμός του αίματος πρέπει να διενεργείται στο τέλος της περιόδου δοκιμασίας. Οι περιοχές δοκιμασίας που θεωρούνται κατάλληλες για όλες τις μελέτες είναι η ηλεκτρολυτική ισορροπία, ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η λειτουργία του ήπατος και του νεφρού. Η επιλογή ιδιαίτερων δοκιμασιών θα επηρεασθεί από τις παρατηρήσεις για τον τρόπο επενέργειας την ουσία. Προτείνονται προσδιορισμοί του ασβεστίου, του φωσφόρου, των γλυκοζιδίων, του νατρίου, του καλίου, της γλυκόζης νηστείας (με περίοδο νηστείας ανάλογα με το είδος του ζώου), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος του ορού (1), της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξικού οξέος του ορού (2), της αποκαρβοξυλάσης της οριθίνης, της γ-γλουταμιλοτρανσεπτιδάσης, του αζώτου ουρίας, του λευκόματος, της κρεατινίνης του αίματος, της συνολικής χοληρυθρίνης και της συνολικής πρωτεΐνης του ορού. Άλλοι προσδιορισμοί που μπορεί να είναι αναγκαίοι για μια επαρκή τοξικολογική εκτίμηση περιλαμβανόμενων αναλύσεων των λιπιδίων, των ορμονών, της ισορροπίας οξέος/βάσης, της μεθαιμοσφαιρίνης και της δραστηριότητας της χολινεστεράσης. Πρόσθετη κλινική βιοχημική εξέταση μπορεί να διενεργηθεί, όπου είναι αναγκαία, για την επέκταση της έρευνας των παρατηρούμενων αποτελεσμάτων.
- δ) η ανάλυση των ούρων δεν απαιτείται επί τακτικής βάσης, αλλά μόνο όταν υπάρξει ένδειξη που θα βασίζεται σε αναμενόμενη ή παρατηρούμενη τοξικότητα.

Εάν τα βασικά ιστορικά στοιχεία είναι ανεπαρκή, πρέπει να εξετασθεί αν χρειάζεται να ληφθεί υπόψη ο προσδιορισμός των αιματολογικών και κλινικών βιοχημικών παραμέτρων πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Μακροσκοπική νεκροψία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκροψία που θα περιλαμβάνει εξέταση της εξωτερικής επιφάνειας του σώματος, όλων των στομιών, καθώς επίσης και της κρανιακής, θωρακικής και κοιλιακής κοιλότητας και του περιεχομένου τους. Το ήπαρ, οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι όρχις πρέπει να ζυγισθούν υγρά το συντομότερο δυνατόν μετά την ανατομή έτσι ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση. Τα παρακάτω όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: όλες οι μακροσκοπικές βλάβες, οι πνεύμονες —που πρέπει να αφαιρεθούν ανέπαφοι, να ζυγισθούν και να τύχουν επεξεργασίας με κατάλληλο στερεωτικό, έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η διατήρηση της δομής του πνεύμονα (η έκχυση με στερεωτικό θεωρείται σαν αποτελεσματική διαδικασία)—, οι ρινοφαρυγγικοί ιστοί, ο εγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας εγκεφάλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/ παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί, η τραχεία, οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήν, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα (τα βοηθητικά γεννητικά όργανα), (το δέρμα), η χοληδόχος κύστη (εάν υπάρχει), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας (ο μαστικός αδένας θήλεος), (το μυϊκό σύστημα μηρών), το περιφερικό νεύρο (οι οφθαλμοί), το στέρνο με μυελό των οστών (το μηριαίο οστό), συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας), ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυγνικό, μεσοθωρακικό και οσφυϊκό). Οι ιστοί που αναφέρονται μεταξύ παρενθέσεων χρειάζονται εξέταση μόνο εάν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας ή επιπλοκής οργάνων που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης.

Ιστοπαθολογική εξέταση

- α) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί στην αναπνευστική οδό και στα άλλα όργανα και στους ιστούς όλων των ζώων που ανήκουν στις ομάδες μάρτυρες και υψηλής δόσης.
- β) Όλες οι μακροσκοπικές βλάβες πρέπει να εξετασθούν.
- γ) Τα όργανα, που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης σε άλλες ομάδες δόσης πρέπει να εξετασθούν.
- δ) Οι πνεύμονες των ζώων στις ομάδες χαμηλής και ενδιάμεσης δόσης πρέπει να υποστούν ιστοπαθολογική εξέταση, γιατί μ' αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται εύκολη εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων. Μπορεί να μην απαιτείται πρόσθετη ιστοπαθολογική εξέταση στα ζώα των ομάδων επί τακτικής βάσης αλλά πρέπει πάντοτε να διενεργείται σε όργανα τα οποία παρουσίασαν ίχνη βλάβης στην ομάδα υψηλής δόσης.
- ε) Όταν χρησιμοποιείται δορυφορική ομάδα, η ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διενεργείται σε ιστούς και όργανα τα οποία έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζουν επιδράσεις σε άλλες ομάδες που υφίστανται την αγωγή.

(1) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.

(2) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες, τον τύπο των βλαβών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες του περιβάλλοντος, διαίτα, κλπ.,
- συνθήκες δοκιμασίας:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης: περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή του αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε πειραματικό θάλαμο, σε περίπτωση χρησιμοποίησής του. Πρέπει να γίνει περιγραφή του εξοπλισμού για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, εφόσον είναι δυνατό, της σταθερότητας των συγκεντρώσεων αεροζόλ ή του μεγέθους σωματιδίων.

Δεδομένα της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία: τα δεδομένα αυτά πρέπει να εμφανίζονται σε μορφή πίνακα και να παρουσιάζονται με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή απόκλιση), και πρέπει να περιλαμβάνουν:

- α) ταχύτητα ροής του αέρα μέσα από τον εξοπλισμό εισπνοής;
 - β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα;
 - γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα δοκιμαζόμενης ουσίας που εισάγεται στον εξοπλισμό εισπνοής διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα);
 - δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε;
 - ε) πραγματικές συγκεντρώσεις μέσα στη ζώνη αναπνοής του πειράματος;
 - ζ) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),
- στοιχεία τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και συγκέντρωση,
 - επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν επέφερε κανένα αποτέλεσμα, εφόσον είναι δυνατόν,
 - χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
 - περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,
 - χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
 - στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,
 - οφθαλμολογικά ευρήματα,
 - αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα,
 - κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και αποτελέσματα (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),
 - ευρήματα νεκροψίας,
 - λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
 - στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,
 - συζήτηση των αποτελεσμάτων,
 - ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 30

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος B.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος B.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται κανονικά επτά ημέρες την εβδομάδα, από κατάλληλη οδό, σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων (μία δόση ανά ομάδα), για ένα σημαντικό μέρος της ζωής τους. Κατά τη διάρκεια και μετά την έκθεσή τους στη δοκιμαζόμενη ουσία, τα πειραματόζωα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση ενδείξεων τοξικότητας.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προπαρασκευή

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματόζωα

Το προτιμώμενο είδος είναι ο αρουραίος. Με βάση τα αποτελέσματα μελετών που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν, μπορούν να χρησιμοποιούν άλλα είδη ζώων (τροφικά ή μη τροφικά). Πρέπει να χρησιμοποιούνται ποικιλίες νέων υγιών ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως στα εργαστήρια, και η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει το συντομότερο δυνατό μετά τον απογαλακτισμό.

Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που έχει διεξαχθεί υποχρόνια μελέτη τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το στόμα για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μία μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Στην περίπτωση των τροφικών, πρέπει να χρησιμοποιηθούν 40 τουλάχιστον ζώα (20 θηλυκά και 20 αρσενικά) σε κάθε επίπεδο δόσης και συμπτύσσουσα ομάδα μάρτυρα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν έχουν προγραμματιστεί θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από το τέλος της μελέτης.

Στην περίπτωση των μη τροφικών, είναι αποδεκτός μικρότερος αριθμός ζώων, τουλάχιστον όμως τέσσερα ζώα ανά φύλο ανά ομάδα.

Επίπεδα δόσεων και συχνότητα έκθεσης

Εκτός από τη συμπτύσσουσα ομάδα μάρτυρα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλό για να προκαλέσει σαφή σημεία τοξικότητας, χωρίς να προκαλέσει όμως υπερβολική θνησιμότητα. Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν θα πρέπει να προκαλέσει οποιαδήποτε τοξικότητα. Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να κυμαίνονται σε ένα μέσο επίπεδο μεταξύ της υψηλής και χαμηλής δόσης. Για την επιλογή των επιπέδων δόσεων θα πρέπει να ληφθούν υπόψη στοιχεία από προηγούμενες δοκιμασίες και μελέτες τοξικότητας.

Η συχνότητα έκθεσης είναι κανονικά καθημερινή. Η χημική ουσία πρέπει να είναι συνεχώς διαθέσιμη, εφόσον χορηγείται με το πόσιμο νερό ή αναμειγνύεται στη διαίτα.

Ομάδες μάρτυρες

Πρέπει να χρησιμοποιείται συγχρόνως ομάδα μάρτυρας όμοια από κάθε άποψη με τις ομάδες που υποβάλλονται σε έκθεση, εκτός ως προς την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία.

Σε ειδικές περιπτώσεις, όπως σε μελέτες στις οποίες η λήψη της ουσίας γίνεται με εισπνοή, σε μελέτες που αφορούν αεροζόλ ή τη χρήση ενός γαλακτοματοποιητικού μέσω μη χαρακτηρισμένης βιολογικής δράσης, σε μελέτες στις οποίες η ουσία λαμβάνεται από το στόμα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί παράλληλα αρνητική ομάδα μάρτυρας. Τα ζώα της ομάδας αρνητικού ελέγχου έχουν την ίδια μετεξέλιξη όπως όλα τα άλλα πειραματόζωα, με την εξαίρεση ότι η ομάδα αυτή ελέγχου δεν θα πρέπει να εκτεθεί στη δοκιμαζόμενη ουσία ή σε οποιοδήποτε έκδοχο.

Οδός λήψης

Οι δύο κύριες οδοί λήψης είναι από το στόμα και με την εισπνοή. Η επιλογή τη οδού λήψης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της δοκιμαζόμενης ουσίας και από την πιθανή οδό έκθεσης για τους ανθρώπους.

Η χρήση της δερματικής οδού παρουσιάζει σημαντικά πρακτικά προβλήματα. Η χρόνια συστηματική τοξικότητα που προκύπτει από διαδερμική απορρόφηση μπορεί κανονικά να συναχθεί από τα αποτελέσματα της μελέτης με λήψη της ουσίας από το στόμα και η γνώση της έκτασης της διαδερμικής απορρόφησης να προκύψει από προηγούμενα πειράματα διαδερμικής τοξικότητας.

Μελέτες στις οποίες η ουσία λαμβάνεται από το στόμα

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία απορροφάται από τη γαστρεντερική οδό, και εάν η οδός εισαγωγής αποτελεί μια οδό από την οποία μπορούν να εκτεθούν οι άνθρωποι, προτιμάται η λήψη από το στόμα εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις.

Τα ζώα μπορούν να λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία στη διαίτα τους, διαλυμένη σε πόσιμο νερό, ή σε κάψουλες.

Το ιδανικότερο είναι να εφαρμόζεται καθημερινή χορήγηση δόσεων επί εκτά ημέρες την εβδομάδα, γιατί η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα πιθανόν να επιτρέψει ανάληψη ή την υποχώρηση της τοξικότητας κατά την περίοδο που δεν χορηγούνται δόσεις, και έτσι να επηρεάσει το αποτέλεσμα και τη μετέπειτα εκτίμηση. Ωστόσο, από πρακτική άποψη, η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα θεωρείται σαν αποδεκτή.

Μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή

Επειδή οι μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή παρουσιάζουν πιο περίπλοκα τεχνικά προβλήματα απ' ό,τι οι άλλες οδοί λήψης, παρέχονται εδώ λεπτομερέστερες οδηγίες γι' αυτόν τον τρόπο λήψης. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη μπορεί να αποτελέσει μια αποδεκτή εναλλακτική λύση σε ιδιαίτερες περιπτώσεις.

Οι μακροπρόθεσμες εκθέσεις σχεδιάζονται συνήθως με βάση την υφιστάμενη προοπτική για ανθρώπινη έκθεση, εκθέτοντας τα ζώα καθημερινά επί έξι ώρες μετά από την εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμου, επί πέντε ημέρες την εβδομάδα (διαλείπουσα έκθεση), ή, σε ενδεχόμενη έκθεση περιβάλλοντος, 22 έως 24 ώρες έκθεσης ανά ημέρα επί εκτά ημέρες την εβδομάδα (συνεχής έκθεση), με μία ώρα περίπου την ημέρα για διατροφή των ζώων σε παραπλήσια ώρα και για συντήρηση του θαλάμου. Και στις δύο περιπτώσεις, τα ζώα εκτίθενται συνήθως με μια καθορισμένη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας. Μία βασική διαφορά που πρέπει να ληφθεί υπόψη μεταξύ διαλείπουσας και συνεχούς έκθεσης είναι ότι στην πρώτη υπάρχει μία δεκαεπτάωρη μέχρι δεκαοκτάωρη περίοδος κατά την οποία τα ζώα μπορούν να αναλάβουν από τις επιδράσεις της κάθε καθημερινής έκθεσης, καθώς επίσης και μία ακόμη μεγαλύτερη περίοδος ανάληψης κατά τα σαββατοκύριακα.

Η επιλογή της διαλείπουσας ή συνεχούς έκθεσης εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και από τις συνθήκες της ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία τις οποίες πρέπει να απομνηθεί. Παρ' όλα αυτά όμως, πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες τεχνικές δυσκολίες. Επί παραδείγματι, τα πλεονεκτήματα της συνεχούς έκθεσης για την απομύμηση συνθηκών περιβάλλοντος μπορεί να αντισταθμιστούν από την ανάγκη χορήγησης νερού και τροφής κατά τη διάρκεια της έκθεσης και από την ανάγκη περισσότερο περίπλοκων (και αξιόπιστων) τεχνικών παραγωγής και παρακολούθησης αεροζόλ και ατμών.

Θάλαμοι έκθεσης

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται σε θαλάμους εισπνοής που είναι σχεδιασμένοι να υφίστανται μία δυναμική ροή δώδεκα τουλάχιστον αλλαγών αέρα ανά ώρα, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης στην ουσία. Οι θάλαμοι μάρτυρες και θάλαμοι έκθεσης πρέπει να είναι τελείως όμοιοι στην κατασκευή και στη σχεδίαση έτσι ώστε να εξασφαλίζουν συγκρίσιμες συνθήκες έκθεσης από όλες τις απόψεις, με την εξαίρεση της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία. Μία ελαφρή αρνητική πίεση μέσα στο θάλαμο διατηρείται συνήθως για την πρόληψη διαρροής της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γύρω χώρο. Οι θάλαμοι πρέπει να ελαχιστοποιούν το συνωστισμό των πειραματόζωων. Σαν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας του θαλάμου πρέπει να οριστεί ότι ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του όγκου του θαλάμου.

Πρέπει να διενεργηθούν οι παρακάτω μετρήσεις ή έλεγχοι:

- i) Ροή αέρα: η ταχύτητα ροής του αέρα διά μέσου του θαλάμου πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς.
- ii) Συγκέντρωση: κατά τη διάρκεια της περιόδου καθημερινής έκθεσης η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν θα πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 15\%$ της μέσης τιμής.
- iii) Θερμοκρασία και υγρασία: για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους $22 \pm 2^\circ\text{C}$ και η υγρασία μέσα στο θάλαμο σε 30 έως 70%, εκτός από τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται νερό για την ενυδάτωση της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα του θαλάμου. Κατά προτίμηση, τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία θα πρέπει να παρακολουθούνται συνεχώς.
- iv) Μετρήσεις μεγέθους σωματιδίων: στην ατμόσφαιρα του θαλάμου πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στα υγρά ή στερεά αεροζόλ. Τα σωματίδια αεροζόλ πρέπει να είναι αναπνεύσιμου μεγέθους για το χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο. Δείγματα ατμόσφαιρας θαλάμου πρέπει να λαμβάνονται στην περιοχή αναπνοής των ζώων. Το δείγμα αέρα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό της κατανομής των σωματιδίων στα οποία εκτίθενται τα ζώα και πρέπει να αντιπροσωπεύει, επί σταθμικής βάσης, όλο το αναωρούμενο αεροζόλ, ακόμη και όταν μεγάλη ποσότητα από το αεροζόλ δεν είναι αναπνεύσιμη. Οι αναλύσεις μεγέθους πρέπει να διενεργούνται συχνά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής ώστε να εξασφαλιστεί η σταθερότητα του αεροζόλ, και μετέπειτα, κατά τη διάρκεια των εκθέσεων, μόνον εφόσον παρίσταται ανάγκη, για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή σωματιδίων στα οποία εκτέθηκαν τα ζώα.

Διάρκεια της μελέτης

Η διάρκεια της περιόδου χορήγησης πρέπει να είναι τουλάχιστον δώδεκα μήνες.

Διαδικασία

Παρατηρήσεις

Μια φορά τουλάχιστον κάθε μέρα πρέπει να διεξάγεται προσεκτική κλινική εξέταση. Πρόσθετες παρατηρήσεις πρέπει να διενεργούνται καθημερινά με λήψη κατάλληλων μέτρων για την ελαχιστοποίηση της απώλειας ζώων από τη μελέτη, π.χ. νεκροψία ή κατάψυξη των ζώων εκείνων που βρέθηκαν νεκρά και απομόνωση ή θανάτωση των ασθενών ή των ετοιμοθάνατων ζώων. Πρέπει να διενεργούνται προσεκτικές παρατηρήσεις για την ανίχνευση της εμφάνισης και της πορείας όλων των τοξικών επιδράσεων καθώς επίσης και για την ελαχιστοποίηση των απωλειών λόγω ασθενειών, αυτόλυσης των ιστών ή κανibalισμού.

Πρέπει να καταγράφονται για όλα τα ζώα κλινικές ενδείξεις, που περιλαμβάνουν νευρολογικές και οφθαλμολογικές μεταβολές, καθώς επίσης και οι θάνατοι. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος της εμφάνισης και εξέλιξης των τοξικών συνθηκών, συμπεριλαμβανομένων των ύποπτων όγκων.

Το βάρος του σώματος πρέπει να καταγράφεται ατομικά για όλα τα ζώα μια φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της περιόδου της μελέτης, και μετέπειτα μια φορά τουλάχιστον κάθε τέσσερις εβδομάδες. Η λήψη τροφής πρέπει να καθορίζεται κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της μελέτης, και μετέπειτα κατά τρίμηνα περίπου διαστήματα, εκτός εάν οι μεταβολές στην κατάσταση της υγείας ή στο βάρος του σώματος υπαγορεύουν τη λήψη άλλων μέτρων.

Αιματολογική εξέταση

Αιματολογική εξέταση (π.χ. περιεχόμενο αιμοσφαιρίνης, όγκος συσσωρευμένων κυττάρων, συνολικός αριθμός ερυθρών κυττάρων αίματος, συνολικός αριθμός λευκών κυττάρων αίματος και αιματοπεταλίων, ή άλλες μετρήσεις της ηκτικής ικανότητας του αίματος) πρέπει να διενεργείται στους τρεις μήνες, έξι μήνες, και μετέπειτα κατά διαστήματα έξι περίπου μηνών, καθώς επίσης και κατά το τέλος του πειράματος, σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν από όλα τα μη τρωκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες. Εάν είναι δυνατόν, οι αιμοληψίες πρέπει να γίνουν από τους ίδιους αρουραίους σε κάθε ένα από τα παραπάνω ανεφερθέντα χρονικά διαστήματα. Επίσης, πρέπει να ληφθεί ένα προπαρασκευαστικό δείγμα από μη τρωκτικά.

Εάν οι κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν μια επιδείνωση της υγείας των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα πρέπει να διενεργηθεί μια μέτρηση του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος των προσβληθέντων ζώων.

Διαφορική μέτρηση του αίματος διενεργείται στα δείγματα εκείνων των ζώων που ανήκουν στην ομάδα της υψηλότερης δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Μετρήσεις του διαφορικού τύπου του αίματος διενεργούνται για την επόμενη ομάδα ή ομάδες χαμηλότερης δόσης μόνον εάν υπάρχει βασική διαφορά μεταξύ της ομάδας υψηλότερης δόσης και των ομάδων μάρτυρων, ή εάν ενδεικνύεται από παθολογικά ευρήματα.

Ανάλυση ούρων

Δείγματα ούρων από όλα τα μη τρωκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες (εάν είναι δυνατόν από τους ίδιους αρουραίους και κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω στις αιματολογικές εξετάσεις) θα πρέπει να συγκεντρώνονται για ανάλυση. Οι παρακάτω μετρήσεις πρέπει να γίνονται είτε σε μεμονωμένα ζώα είτε σε συγχωνευμένο δείγμα ανά φύλο ανά ομάδα για τα τρωκτικά:

— εμφάνιση: όγκος και πυκνότητα για κάθε ζώο χωριστά

- πρωτεΐνη, γλυκόζη, κετόνες, λανθάνουσα αιμορραγία (ημιποσοτικά)
- μικροσκοπική εξέταση ιζήματος (ημιποσοτικά).

Κλινική χημική ανάλυση

Κατά διαστήματα έξι μηνών περίπου και στο τέλος της μελέτης λαμβάνονται δείγματα αίματος για κλινικές χημικές μετρήσεις από όλα τα μη τροκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες, αν είναι δυνατόν, από τους ίδιους αρουραίους σε κάθε χρονικό διάστημα. Επίσης, πρέπει να ληφθεί ένα προπαρασκευασμένο δείγμα από τα μη τροκτικά. Προπαρασκευάζεται πλάσμα από τα δείγματα αυτά και γίνονται οι παρακάτω μετρήσεις:

- συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης,
- συγκέντρωση αλβουμίνης,
- δοκιμασίες λειτουργίας του ήπατος (όπως είναι η δράση της αλκαλικής φωσφατάσης, της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και πυροσταφυλικού οξέος (1) και της τρανσαμινάσης του γλουταμινικού και οξαλοξικού οξέος (2)), η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης,
- ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, όπως είναι η νηστεία γλυκόζης του αίματος,
- δοκιμασίες λειτουργίας νεφρού, όπως είναι το άζωτο ουρίας του αίματος.

Μακροσκοπική νεκρωσία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκρωσία, που περιλαμβάνει εκείνα που πέθαναν κατά τη διάρκεια του πειράματος ή τα ετοιμοθάνατα ζώα που θανατώθηκαν. Πριν από τη θανάτωση όλων των ζώων, πρέπει να ληφθούν δείγματα αίματος από όλα τα ζώα για μετρήσεις του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος. Όλες οι μακροσκοπικά ορατές βλάβες, οι όγκοι ή οι βλάβες που προκαλούν υποψία για την ύπαρξη όγκων πρέπει να διατηρηθούν. Πρέπει να γίνει προσπάθεια για τη συσχέτιση όλων των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

Όλα τα όργανα και οι ιστοί πρέπει να διατηρηθούν για ιστοπαθολογική εξέταση. Αυτή συνήθως αφορά τα παρακάτω όργανα και ιστούς: ο εγκέφαλος (3) (μυελός/γέφυρα, παρεγκεφαλικός και εγκεφαλικός φλοιός), η υπόφυση, ο θυρεοειδής (συμπεριλαμβανομένου του παραθυρεοειδούς), ο θύμος, οι πνεύμονες (συμπεριλαμβανομένης της τραχείας), η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ (3), η σπλήνα, οι νεφροί (3), τα επινεφρίδια (3), ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η μήτρα, η ουροδόχος κύστη, οι λεμφαδένες, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες (3), τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, ο μαστικός αδένας θήλεος, το δέρμα, το μυϊκό σύστημα, το περιφερικό νεύρο, ο νωτιαίος μυελός (αυχενικός, μεσοθωρακικός και οσφυϊκός), το στέρνο με μυελό των οστών και το μηριαίο οστό (συμπεριλαμβανομένης της άρθρωσης) και οι οφθαλμοί.

Η διόγκωση των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης με στερεωτικό αποτελεί τον καλύτερο τρόπο για τη διατήρηση των ιστών αυτών· η διόγκωση των πνευμόνων σε μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή είναι βασική για κατάλληλη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε ειδικές μελέτες, όπως είναι οι μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή, πρέπει να μελετηθεί ολόκληρη η αναπνευστική οδός συμπεριλαμβανομένης της ρινός, του φάρυγγα και του λάρυγγα.

Εάν διεξαχθούν άλλες κλινικές εξετάσεις, οι πληροφορίες που θα ληφθούν από τις διαδικασίες αυτές πρέπει να είναι διαθέσιμες πριν από την μικροσκοπική εξέταση, γιατί μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό μέσο καθοδήγησης για τον παθολόγο.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Όλες οι ορατές μεταβολές, ιδιαίτερα οι όγκοι και οι άλλες βλάβες που παρουσιάζονται σε οποιοδήποτε όργανο πρέπει να εξεταστούν μικροσκοπικά. Επίσης, συνιστώνται οι παρακάτω διαδικασίες:

- α) Μικροσκοπική εξέταση όλων των διατηρημένων οργάνων και ιστών με πλήρη περιγραφή όλων των βλαβών που βρέθηκαν για:
 1. όλα τα ζώα που πέθαναν ή θανατώθηκαν κατά τη διάρκεια της μελέτης και
 2. όλα τα ζώα της ομάδας του υψηλότερου επιπέδου δόσης και των ομάδων μαρτύρων.
- β) Τα όργανα ή οι ιστοί που παρουσιάζουν ανωμαλίες, που προκλήθηκαν ή που υπάρχουν υπόνοιες ότι προκλήθηκαν από τη δοκιμαζόμενη ουσία, εξετάζονται επίσης στις ομάδες χαμηλότερης δόσης.
- γ) Σε περίπτωση που το αποτέλεσμα της δοκιμασίας παρέχει ενδείξεις μείωσης της κανονικής διάρκειας ζωής των ζώων ή επαγωγής επιδράσεων που θα μπορούσαν να προκαλέσουν μια τοξική αντίδραση, πρέπει να εξεταστεί το επόμενο επίπεδο χαμηλότερης δόσης, όπως περιγράφηκε παραπάνω.
- δ) Πληροφορίες για τη συχνότητα εμφάνισης βλαβών, που συνήθως παρουσιάζονται στην ποικιλία των χρησιμοποιούμενων ζώων, κάτω από τις ίδιες εργαστηριακές συνθήκες, δηλαδή ιστορικά δεδομένα ελέγχου, είναι απαραίτητα για την ορθή αξιολόγηση της σημασίας των μεταβολών που παρατηρούνται στα εκτιθέμενα ζώα.

(1) Γνωστή τόξα σαν αιμοτρανσφεράση της αλανίνης του ορού.

(2) Γνωστή τόξα σαν αιμοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος του ορού.

(3) Τα όργανα αυτά, από δέκα ζώα ανά φύλο ανά ομάδα για τα τροκτικά και όλα τα μη τροκτικά και επιπλέον ο θυρεοειδής (με τον παραθυρεοειδή) για όλα τα μη τροκτικά, πρέπει να ζυγιστούν.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που θα παρουσιάζει για κάθε ομάδα του πειράματος τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή του πειράματος, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν βλάβες και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο βλάβης. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες του περιβάλλοντος, διαίτα κλπ.
- συνθήκες δοκιμασίας:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης:

περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε θάλαμο δοκιμασίας, εφόσον χρησιμοποιηθεί. Πρέπει επίσης να περιγραφεί ο εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, εφόσον χρειάζεται, της σταθερότητας της συγκέντρωσης αεροζόλ ή μεγέθους σωματιδίων.

Δεδομένα έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία:

τα δεδομένα αυτά πρέπει να συνοψισθούν με μορφή πίνακα και να παρουσιαστούν με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή διακύμανση) και πρέπει να περιλαμβάνουν:

- α) ταχύτητες ροής του αέρα διαμέσου της συσκευής εισπνοής
- β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα
- γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που εισάγεται στη συσκευή εισπνοής, διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα)
- δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε
- ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στη ζώνη αναπνοής της δοκιμασίας
- ζ) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),
- επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,
- δεδομένα τοξικής αντίδρασης κατά δόση και φύλο,
- επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις,
- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
- περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,
- χρόνο που παρατηρήθηκε κάθε ανωμαλία και η μετέπειτα πορεία της,
- στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,
- οφθαλμολογικά ευρήματα,
- αιματολογικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους,
- κλινικές βιοχημικές εξετάσεις που διενεργήθηκαν και όλα τα αποτελέσματά τους (συμπεριλαμβανομένων των αποτελεσμάτων τυχόν ανάλυσης ούρων),
- ευρήματα νεκροψίας,
- λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου είναι δυνατόν,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 31

ΜΕΛΕΤΗ ΤΕΡΑΤΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε προοδευτικά αυξανόμενες δόσεις ή συγκεντρώσεις, τουλάχιστον κατά τη διάρκεια του τμήματος εκείνου της εγκυμοσύνης που καλύπτει την περίοδο της οργανογένεσης, σε διάφορες ομάδες εγκύων πειραματοζώων (μία δόση ανά ομάδα). Λίγο πριν από την αναμενόμενη ημερομηνία του τοκετού, θανατώνεται η μητέρα, αφαιρείται η μήτρα και εξετάζεται το περιεχόμενο. Η μέθοδος αυτή καλύπτει την εμβρυοτοξικότητα και την εμβρυονική (ή νεογνική) τοξικότητα.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προπαρασκευή

Υγιή νεαρά, ενήλικα, παρθένα θηλυκά ζώα ανάλογης ηλικίας και μεγέθους εγκλιματίζονται προς τις εργαστηριακές συνθήκες επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από το πείραμα και κατόπιν ζευγαρώνονται με αρσενικά αποδειγμένης γονιμότητας. Τα γονιμοποιημένα θηλυκά ζώα ξεχωρίζονται και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής.

Το ζευγάριωμα μπορεί να επιτευχθεί κατά φυσικό τρόπο ή με τεχνητή γονιμοποίηση. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται καθημερινά στα θηλυκά ζώα αρχίζοντας αμέσως μετά την εμφύτευση και συνεχίζοντας σε όλη τη διάρκεια της περιόδου οργανογένεσης. Μία ημέρα πριν από το τέλος, τα έμβρυα αποσπώνται με υστερεκτομή και εξετάζονται για ανωμαλίες των σπλάχνων ή του σκελετού, συμπεριλαμβανομένης της καθυστέρησης της ανάπτυξης, της καθυστερημένης οστεοποίησης και των εντερικών αιμορραγιών.

Συνθήκες δοκιμασίας

Πειραματοζώα

Τα είδη που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ο αρουραίος, ο ποντικός, ο κρικητός ο γνήσιος (χάμστερ) και το κουνέλι. Τα προτιμώμενα είδη είναι ο αρουραίος και το κουνέλι. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ποικιλίες ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστήριο. Η ποικιλία του ζώου δεν πρέπει να παρουσιάζει χαμηλή γονιμότητα και πρέπει να χαρακτηρίζεται για την αντίδρασή της στα τερατογόνα. Τα ζώα πρέπει να διαμένουν σε χωριστά κλουβιά.

Αριθμός και φύλο

Για κάθε επίπεδο δόσης απαιτούνται τουλάχιστον είκοσι έγκυοι αρουραίοι, ποντικοί ή κρικητοί (χάμστερ) ή δώδεκα έγκυα κουνέλια. Αυτό έχει σαν σκοπό την εξασφάλιση παραγωγής επαρκών νεογνών που να επιτρέπουν μια εκτίμηση της τερατογενετικής ικανότητας της ουσίας.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες δόσεων και μια ομάδα μάρτυρας. Πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται μία ομάδα μάρτυρας για το έκδοχο, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται με έκδοχο. Στην περίπτωση χρησιμοποίησης εκδόχου, πρέπει να είναι γνωστές οι τοξικολογικές ιδιότητές του, που δεν πρέπει να είναι τερατογενετικές ή να παρουσιάζουν επιδράσεις στην αναπαραγωγή. Εκτός από την αγωγή με τη δοκιμαζόμενη

ουσία, τα ζώα στις ομάδες μάρτυρες πρέπει κατά τα άλλα να έχουν την ίδια μεταχείριση με εκείνη της ομάδας δοκιμασίας. Εκτός εάν περιοριστεί από το φυσικό/χημικό χαρακτήρα ή τις βιολογικές ιδιότητες της ουσίας, το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει θεωρητικά να προκαλεί κάποια έκδηλη μητρική τοξικότητα, όπως είναι η ελαφρή απώλεια βάρους, αλλά όχι περισσότερο από 10% μητρικού θανάτου. Το χαμηλό επίπεδο δόσης δεν θα πρέπει να προκαλεί παρατηρήσιμες επιδράσεις που να μπορούν να αποδοθούν στη δοκιμαζόμενη ουσία. Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να ορισθούν κατά γεωμετρική πρόοδο μεταξύ των επιπέδων υψηλής και χαμηλής δόσης.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσίων χαμηλής τοξικότητας, εάν ένα επίπεδο δόσης 1 000 mg/kg τουλάχιστον δεν παράγει ίχνη εμβρυοτοξικότητας ή τερατογενετικότητας, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να μη θεωρηθούν απαραίτητες.

Χρόνος έκθεσης

Η ημέρα 0 στη δοκιμασία είναι η ημέρα κατά την οποία παρατηρείται το κολπικό βύσμα ή/και το σπέρμα (στην περίπτωση που είναι εφικτό). Η περίοδος χορήγησης δόσεων πρέπει να καλύπτει την περίοδο της βασικής οργανογένεσης. Η περίοδος αυτή μπορεί να οριστεί ανάμεσα στην έκτη και στη δέκατη πέμπτη ημέρα για τον αρουραίο και τον ποντικό, στην έκτη και στη δέκατη τέταρτη ημέρα για τον κρικινό ή στην έκτη και στη δέκατη όγδοη ημέρα για το κουνέλι. Εάν η ημέρα 0 βασίζεται στην παρατήρηση του ζευγαρώματος ή της τεχνητής γονιμοποίησης, οι παραπάνω χρόνοι πρέπει να διορθωθούν με την προσθήκη μιας ημέρας. Εναλλακτικά, η περίοδος χορήγησης δόσεων μπορεί να εκτεταθεί μέχρι μία ημέρα περίπου πριν από την αναμενόμενη ημερομηνία τοκετού.

Περίοδος παρατήρησης

Προσεκτική κλινική εξέταση πρέπει να διενεργείται μία φορά τουλάχιστον κάθε ημέρα. Πρόσθετες παρατηρήσεις πρέπει να διενεργούνται καθημερινά με τη λήψη κατάλληλων μέτρων για την ελαχιστοποίηση της απώλειας ζώων από τη μελέτη.

Διαδικασία

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα με καθετήρα στομάχου την ίδια ώρα κατά προσέγγιση κάθε ημέρα.

Τα θηλυκά πειραματόζωα λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία καθημερινά καθ' όλη τη διάρκεια της σχετικής περιόδου αγωγής. Η δόση μπορεί να βασίζεται στο βάρος των θηλυκών κατά την έναρξη της αγωγής ή, εναλλακτικά, εν όψει της ταχείας απόκτησης βάρους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τα ζώα μπορούν να ζυγίζονται περιοδικά και οι δόσεις να βασίζονται στη πλέον πρόσφατη μέτρηση βάρους. Οι ενδείξεις τοξικότητας πρέπει να καταγράφονται μόλις παρατηρούνται, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειάς τους. Τα θηλυκά που παρουσιάζουν σημεία αποβολής ή πρόωπου τοκετού πρέπει να θανατώνονται και να υφίστανται προσεκτική μακροσκοπική εξέταση. Η περίοδος παρατήρησης μετά την αγωγή πρέπει να συνεχιστεί μέχρι την προηγούμενη ημέρα περίπου πριν από τον τοκετό. Αυτό έχει σαν σκοπό να καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της περιόδου εγκυμοσύνης αλλά να αποφευχθούν επιπλοκές στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων, τα οποία θα μπορούσαν να προκύψουν μετά από φυσικό τοκετό.

Οι παρατηρήσεις «κλαβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους μύνες, καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς, αλλά να μην περιορίζονται μόνο σ' αυτά. Πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις για την κατανάλωση της τροφής καθώς επίσης και ζύγιση των ζώων κάθε εβδομάδα.

Νεκρωσία

Εφόσον επέλθει θάνατος κατά τη διάρκεια της μελέτης ή κατά το τέλος αυτής, οι μητέρες πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για οποιεσδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές που δυνατόν να επηρέασαν την εγκυμοσύνη. Αμέσως μετά το θάνατο πρέπει να αφαιρεθεί η μήτρα και να εξεταστεί το περιεχόμενό της για εμβρυϊκούς θανάτους και για τον αριθμό των ζωντανών εμβρύων. Είναι συνήθως δυνατό να εκτιμηθεί ο χρόνος θανάτου μέσα στη μήτρα, όπου αυτός έχει επέλθει. Στους ποντικούς και τα κουνέλια, ο αριθμός των ωχρών σάματιων της ωοθήκης μπορεί να προσδιοριστεί. Πρέπει να προσδιοριστεί το φύλο των εμβρύων και να γίνει ζύγιση τους χωριστά για το καθένα, να καταγραφεί το βάρος τους καθώς επίσης και το προκύπτον μέσο εμβρυϊκό βάρος. Μετά την αφαίρεση, κάθε έμβryo πρέπει να εξεταστεί εξωτερικά. Για τους αρουραίους, τα ποντίκια και τους κρικινούς, το ένα τρίτο μέχρι και το ήμισυ του αριθμού των νεογνών κάθε μητέρας πρέπει να εξεταστεί για ανωμαλίες του σκελετού, ενώ το υπόλοιπο μέρος πρέπει να προετοιμαστεί και να εξεταστεί για ανωμαλίες μαλακού ιστού με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων. Για τα κουνέλια, κάθε έμβryo πρέπει να εξεταστεί με προσεκτική ανατομή για σπλαγγινικές ανωμαλίες και έπειτα για ανωμαλίες του σκελετού.

2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με μορφή πίνακα, που να παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που κατέστησαν έγκυα, τον αριθμό και τα ποσοστά των ζωντανών εμβρύων με οποιεσδήποτε ανωμαλίες μαλακού ιστού ή σκελετού, και τέλος της σχέση τους προς ιδιαίτερες ομάδες νεογνών. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες του περιβάλλοντος, διαίτα κλπ.,
- συνθήκες δοκιμασίας,
- επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,
- δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά δόση,
- επίπεδο στο οποίο η ουσία δεν παρουσίασε επιδράσεις (εφόσον είναι δυνατόν),
- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
- περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,
- χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
- στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,
- διάρκεια της εγκομοσύνης και στοιχεία για τα νεογνά που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα (συμπεριλαμβανομένων ιστορικών στοιχείων),
- στοιχεία εμβρύων (ζωντανά/νεκρά, φύλο, βλάβες μαλακού ιστού και σκελετού),
- στοιχεία νεογνών (ζωντανά/νεκρά, φύλο, βλάβες μαλακού ιστού και σκελετού για κάθε νεογνό),
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 32
ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία λαμβάνεται κανονικά επτά ημέρες την εβδομάδα, από κατάλληλη οδό, σε αρκετές ομάδες πειραματοζώων (μία δόση ανά ομάδα για το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους). Κατά τη διάρκεια και μετά την έκθεση στην δοκιμαζόμενη ουσία, τα ζώα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση ενδείξεων τοξικότητας, και ιδιαίτερα για την ανάπτυξη όγκων.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, νέα υγιή ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανομούνται στις απαιτούμενες ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες.

Πειραματόζωα

Το προτιμώμενο είδος είναι ο αρουραίος. Με βάση τα αποτελέσματα μελετών που έχουν διεξαχθεί κατά το παρελθόν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη ζώων (τροκτικά ή μη τροκτικά). Πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη νέων υγιών ζώων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστηριακές μελέτες και η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει το συντομότερο δυνατόν μετά από τον απογαλακτισμό.

Στην αρχή της μελέτης, η διαφορά βάρους ανάμεσα στα ζώα που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που έχει διεξαχθεί υποχρόνια μελέτη με λήψη της ουσίας από το στόμα για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική για μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και στις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν 100 τουλάχιστον ζώα (50 θηλυκά και 50 αρσενικά) σε κάθε επίπεδο δόσης και συμπτύσσουσα ομάδα μάρτυρα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν έχουν προγραμματισθεί θανατώσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης, ο αριθμός πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται, εκτός από τη συμπτύσσουσα ομάδα μάρτυρα, τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλό ώστε να επιφέρει σημεία ελάχιστης τοξικότητας, όπως είναι μία ελαφρή ύφεση στην απόκτηση βάρους του σώματος (λιγότερο από 10%), χωρίς να μεταβάλλει αισθητά την κανονική διάρκεια ζωής λόγω επιδράσεων που δεν σχετίζονται με όγκους.

Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να επηρεάζει την κανονική ανάπτυξη, εξέλιξη και μακροβιότητα του ζώου ή να προκαλεί οποιαδήποτε ένδειξη τοξικότητας. Γενικά, η δόση αυτή δεν πρέπει να είναι χαμηλότερη από 10% από την υψηλή δόση.

Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να οριστούν σ' ένα μέσο επίπεδο μεταξύ της υψηλής και χαμηλής δόσης.

Κατά την επιλογή των επιπέδων δόσεων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στοιχεία από προηγούμενες δοκιμασίες και μελέτες τοξικότητας.

Η συχνότητα της έκθεσης στην ουσία είναι κανονικά καθημερινή. Η χημική ουσία πρέπει να είναι συνεχώς διαθέσιμη, εφόσον χορηγείται με το πόσιμο νερό ή αναμειγνύεται μέσα στο διαιτολόγιο.

Μάρτυρες

Πρέπει να χρησιμοποιείται μια συμπράττουσα ομάδα μάρτυρας, τελείως όμοια από κάθε άποψη με τις εκτιθέμενες ομάδες, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία.

Σε ειδικές περιπτώσεις, όπως είναι στις μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή, που αφορούν αεροζόλ ή τη χρήση γαλακτοματοποιητικής ουσίας μη χαρακτηρισμένης βιολογικής δράσης σε μελέτες λήψης της ουσίας από το στόμα, πρέπει να χρησιμοποιείται μια πρόσθετη ομάδα μάρτυρας η οποία δεν εκτίθεται στο έκδοχο.

Οδός λήψης

Οι τρεις κύριες οδοί λήψης είναι από το στόμα, από το δέρμα και με την εισπνοή. Η επιλογή της οδού λήψης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της δοκιμαζόμενης ουσίας και από την πιθανή μορφή της έκθεσης των ανθρώπων σ' αυτήν.

Δοκιμασίες τοξικότητας ουσίων με λήψη από το στόμα

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία απορροφάται από τη γαστρεντερική οδό και εάν η οδός εισαγωγής αποτελεί μια οδό από την οποία μπορούν να εκτεθούν οι άνθρωποι, προτιμάται η λήψη από το στόμα, εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις. Τα ζώα μπορεί να λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία στο διαιτολόγιό τους, διαλυμένη σε πόσιμο νερό, ή μέσα σε κάψουλες.

Στην ιδανικότερη περίπτωση οι δόσεις χορηγούνται επί επτά ημέρες την εβδομάδα, επειδή η χορήγηση επί πέντε ημέρες την εβδομάδα επιτρέπει την ανάληψη από την τοξικότητα ή την υποχώρησή της κατά την περίοδο που δεν χορηγούνται δόσεις, και έτσι επηρεάζει το αποτέλεσμα και την μετέπειτα αξιολόγηση. Ωστόσο, από πρακτική κυρίως άποψη, η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα θεωρείται σαν αποδεκτή.

Δοκιμασίες τοξικότητας ουσίων με λήψη από το δέρμα

Η δερματική έκθεση με επέλιψη του δέρματος μπορεί να επιλεγεί για την απομimesis μιας κύριας οδού ανθρώπινης έκθεσης και σαν πρότυπο σύστημα για την πρόκληση βλαβών του δέρματος.

Δοκιμασίες τοξικότητας ουσίων με λήψη με την εισπνοή

Επειδή οι μελέτες με λήψη της ουσίας με την εισπνοή παρουσιάζουν πιο περίπλοκα τεχνικά προβλήματα απ' ό,τι οι άλλες οδοί λήψης, δίδονται εδώ λεπτομερέστερες οδηγίες γι' αυτόν τον τρόπο λήψης. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη μπορεί να αποτελέσει μια καλή εναλλακτική λύση σε ιδιαίτερες περιπτώσεις.

Οι μακροπρόθεσμες εκθέσεις σχεδιάζονται συνήθως με βάση υφιστάμενη προοπτική ανθρώπινης έκθεσης, εκθέτοντας τα ζώα καθημερινά επί έξι ώρες, μετά από την εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμου, επί πέντε ημέρες την εβδομάδα (διαλείπουσα έκθεση) ή, σε ενδεχόμενη έκθεση περιβάλλοντος, 22 έως 24 ώρες έκθεσης κάθε ημέρα επί επτά ημέρες την εβδομάδα (συνεχής έκθεση), με μία ώρα περίπου την ημέρα για διατροφή των ζώων σε παραπλήσια ώρα και για συντήρηση των θαλάμων. Και στις δύο περιπτώσεις τα ζώα εκτίθενται συνήθως σε καθορισμένη συγκέντρωση δοκιμαζόμενων ουσίων.

Μια βασική διαφορά που πρέπει να ληφθεί υπόψη μεταξύ διαλείπουσας και συνεχούς έκθεσης είναι ότι στην πρώτη υπάρχει μια δικαεπτάωρη μέχρι δεκαοκτάωρη περίοδος κατά την οποία τα ζώα μπορεί να αναλάβουν από τις επιδράσεις της κάθε καθημερινής έκθεσης καθώς επίσης και μία ακόμη μεγαλύτερη περίοδος ανάληψης κατά τα σββατοκύριακα.

Η επιλογή της διαλείπουσας ή συνεχούς έκθεσης εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και από τις συνθήκες της ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία τις οποίες πρέπει να απομimesis. Παρ' όλα αυτά πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες τεχνικές δυσκολίες. Επί παραδείγματι, τα κλωνοκτίσματα της συνεχούς έκθεσης για την απομimesis συνθήκων περιβάλλοντος μπορεί να αντισταθμιστούν από την ανάγκη χορήγησης νερού και τροφής κατά τη διάρκεια της έκθεσης και από την ανάγκη περισσότερο περίπλοκων (και αξιόπιστων) τεχνικών παραγωγής και παρακολούθησης αεροζόλ και ατμών.

Θάλαμοι έκθεσης

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται σε θαλάμους εισπνοής που είναι σχεδιασμένοι να υφίστανται δυναμική ροή δώδεκα τουλάστιστον αλλαγών αέρα ανά ώρα ώστε να εξασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης στην ουσία. Οι θάλαμοι μάρτυρας και θάλαμοι έκθεσης πρέπει να είναι τελείως όμοιοι στην κατασκευή και στη σχεδίαση ώστε να εξασφαλίζουν συγκρίσιμες συνθήκες έκθεσης απ' όλες τις απόψεις, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία. Μια ελαφρή αρνητική πίεση μέσα στο θάλαμο

διατηρείται συνήθως για την πρόληψη διαρροής της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γύρω χώρο. Οι θάλαμοι πρέπει να ελαχιστοποιούν το συναστισμό των πειραματόζωων. Σαν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας του θαλάμου πρέπει να οριστεί ότι ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει το 5% του όγκου του θαλάμου.

Πρέπει να διενεργούνται οι παρακάτω μετρήσεις ή έλεγχοι:

- i) Ροή αέρα: η ταχύτητα ροής του αέρα διά μέσου του θαλάμου πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς.
- ii) Συγκέντρωση: κατά τη διάρκεια της περιόδου καθημερινής έκθεσης η συγκέντρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 15\%$ της μέσης τιμής. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης αυτής, οι καθημερινές συγκεντρώσεις πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατό σταθερές.
- iii) Θερμοκρασία και υγρασία: για τα τρωκτικά, η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους $22 \pm 2^\circ\text{C}$ και η υγρασία μέσα στο θάλαμο σε 30 έως 70%, εκτός από τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται νερό για την ενυώριση της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα του θαλάμου. Κατά προτίμηση, τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται συνεχώς.
- iv) Μετρήσεις μεγέθους σωματιδίων: στην ατμόσφαιρα του θαλάμου πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στα υγρά ή στερεά αεροζόλ. Τα σωματίδια αεροζόλ πρέπει να είναι αναπνεύσιμου μεγέθους για το χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο. Δείγματα ατμόσφαιρας θαλάμου πρέπει να λαμβάνονται στη ζώνη αναπνοής των ζώων. Το δείγμα αέρα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό της κατανομής των σωματιδίων στα οποία εκτίθενται τα ζώα και πρέπει να αντιπροσωπεύει, επί σταθμικής βάσης, όλο το ενυωρούμενο αεροζόλ, ακόμη και όταν μεγάλη ποσότητα από τα αεροζόλ δεν είναι αναπνεύσιμη. Οι αναλύσεις μεγέθους πρέπει να διεξάγονται συχνά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα του αεροζόλ, και μετέπειτα, κατά τη διάρκεια των εκθέσεων, μόνον εφόσον παρίσταται ανάγκη, για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή σωματιδίων στα οποία εκτέθηκαν τα ζώα.

Διάρκεια της μελέτης

Η διάρκεια ενός πειράματος καρκινογενετικότητας καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της κανονικής διάρκειας ζωής των πειραματόζωων. Η μελέτη πρέπει να τερματίζεται στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρινητούς και στους 24 μήνες για τους αρουραίους. Ωστόσο, για ορισμένες ποικιλίες ζώων με μεγαλύτερη μακροβιότητα ή/και χαμηλό βαθμό αυτογενών όγκων, η μελέτη πρέπει να τελειώνει στους 24 μήνες για τους ποντικούς και τους κρινητούς και στους 30 μήνες για τους αρουραίους. Εναλλακτικά, ο τερματισμός μιας τέτοιας εκτεταμένης μελέτης είναι αποδεκτός όταν ο αριθμός των επιζώντων στην ομάδα της χαμηλότερης δόσης ή στην ομάδα αμάρτυρα φθάνει το 25%. Όταν τελειώσει μια μελέτη στην οποία υπάρχει φανερά διαφορά αντίδρασης ανάμεσα στα δύο φύλα, κάθε φύλο πρέπει να θεωρηθεί σαν αντικείμενο χωριστής μελέτης. Στην περίπτωση που μόνο η ομάδα υψηλής δόσης πεθάνει πρόωρα από προφανείς αιτίες τοξικότητας, το γεγονός αυτό δεν οδηγεί στην περάτωση της μελέτης, αρκεί οι τοξικολογικές εκδηλώσεις να μην προκαλούν προβλήματα στις άλλες ομάδες. Για να γίνει αποδεκτό ένα αρνητικό πειραματικό αποτέλεσμα, δεν πρέπει να έχουν χαθεί από τη δοκιμασία πάνω από 10% των μελών οποιασδήποτε ομάδας λόγω αυτόλυσης των ιστών, κανιβαλισμού ή προβλημάτων διαχείρισης, ενώ τα επιζώντα ζώα απ' όλες τις ομάδες να μην είναι λιγότερα από το 50% στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρινητούς και στους 24 μήνες για τους αρουραίους.

Διαδικασία

Παρατηρήσεις

Οι καθημερινές παρατηρήσεις «κλωβού» πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στην σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απώλειας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες, όπως ο κανιβαλισμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Εφόσον παρατηρούνται ετοιμαθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Πρέπει να καταγράφονται οι κλινικές ενδείξεις και η θνησιμότητα για όλα τα ζώα. Ειδική προσοχή πρέπει να δοθεί στην ανάπτυξη όγκων. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος προσβολής, το σημείο προσβολής, οι διαστάσεις, η εμφάνιση και η εξέλιξη κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου.

Πρέπει να γίνονται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (και την κατανάλωση νερού όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό) κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της μελέτης και μετέπειτα κατά τρίμηνα περίπου διαστήματα εκτός εάν οι μεταβολές στην κατάσταση της υγείας ή στο βάρος του σώματος υπαγορεύουν τη λήψη άλλων μέτρων.

Το βάρος του σώματος πρέπει να καταγράφεται χωριστά για όλα τα ζώα μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της περιόδου της δοκιμασίας και μετέπειτα μία φορά τουλάχιστον κάθε τέσσερις εβδομάδες.

Κλινικές εξετάσεις

Αιματολογική εξέταση

Εάν οι παρατηρήσεις «κλωβού» δείχνουν επιδείνωση της υγείας των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης, πρέπει να διενεργείται μέτρηση του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος των προσβληθέντων ζώων.

Στους 12 μήνες, 18 μήνες και πριν από τη θανάτωση, λαμβάνεται μια κηλίδα αίματος από όλα τα ζώα. Η μέτρηση του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος διενεργείται σε δείγματα ζώων της ομάδας υψηλότερης δόσης και των ομάδων μάρτυρων. Εάν τα στοιχεία αυτά, ιδιαίτερα εκείνα που λαμβάνονται πριν από τη θανάτωση, ή τα στοιχεία που προκύπτουν από την παθολογική εξέταση το υπαγορεύουν, τότε οι μετρήσεις του διαφορικού τύπου των λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος διενεργούνται και για την επόμενη κατά σειρά ομάδα ή ομάδες χαμηλότερης δόσης.

Μακροσκοπική νεκροψία

Πρέπει να διενεργείται πλήρης μακροσκοπική νεκροψία σε όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που πέθαναν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή που θανατώθηκαν σε ετοιμοθάνατη κατάσταση. Όλοι οι μακροσκοπικά ορατοί όγκοι ή βλάβες που προκαλούν υποψία ότι αποτελούν όγκους, πρέπει να διατηρηθούν.

Τα παρακάτω όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν μέσα σε κατάλληλο μέσο για ενδεχόμενη μελλοντική ιστοπαθολογική εξέταση: ο εγκέφαλος —συμπεριλαμβανομένων τμημάτων μυελού/γέφυρας του εγκέφαλου, παρεγκεφαλικού και εγκεφαλικού φλοιού—, η υπόφυση, ο θυρεοειδής/παραθυρεοειδής, όλοι οι θυμικοί ιστοί, η τραχεία και οι πνεύμονες, η καρδιά, η αορτή, οι σιελογόνιοι αδένες, το ήπαρ, η σπλήνα, οι νεφροί, τα επινεφρίδια, το πάγκρεας, οι γεννητικοί αδένες, η μήτρα, τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, τα δέρμα, ο οισοφάγος, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, η νήστις, ο ειλεός, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, η ουροδόχος κύστη, ο αντιπροσωπευτικός λεμφαδένας, ο μαστικός αδένας θηλεός, το μυϊκό σύστημα των μηρών, το περιφερικό νεύρο, το στέρνο με μυελό οστών, το μηριαίο οστόν —συμπεριλαμβανομένης της αρθρικής επιφάνειας—, ο νωτιαίος μυελός σε τρία επίπεδα —αυχενικό, μεσοθωρακικό και οσφυϊκό— και οι οφθαλμοί.

Η διόγκωση των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης με στερεωτικό αποτελεί τον καλύτερο τρόπο για τη διατήρηση των ιστών αυτών, η διόγκωση των πνευμόνων σε μελέτες εισπνοής είναι αναγκαία για κατάλληλη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε μελέτες στις οποίες η ουσία χορηγείται διά της εισπνοής ολόκληρη η αναπνευστική οδός πρέπει να διατηρηθεί, συμπεριλαμβανομένης της ρινικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

- a) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί σε όλα τα όργανα και ιστούς όλων των ζώων που πεθαίνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και σε όλα τα ζώα στις ομάδες μάρτυρες και υψηλής δόσης.
- β) Όλοι οι μακροσκοπικά ορατοί όγκοι ή οι βλάβες, που προκαλούν υποψία ότι είναι όγκοι πρέπει να υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση, σε όλες τις ομάδες.
- γ) Εάν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης νεοπλασματικών βλαβών ανάμεσα στην ομάδα υψηλότερης δόσης και στην ομάδα μάρτυρα, πρέπει να διενεργηθεί ιστοπαθολογική εξέταση στο συγκεκριμένο αυτό όργανο ή ιστό και στις άλλες ομάδες.
- δ) Εάν τα επζώντα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης είναι αισθητά λιγότερα απ' ό,τι εκείνα της ομάδας μάρτυρα, τότε η επόμενη ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.
- ε) Εάν υπάρχουν ενδείξεις στην ομάδα υψηλής δόσης για πρόκληση τοξικών ή άλλων επιδράσεων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν μια νεοπλασματική αντίδραση, τότε η επόμενη ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.

2.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με μορφή πίνακα, παρουσιάζοντας για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν όγκους που διαπιστώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, το χρόνο διαπίστωσης και τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν να έχουν όγκους μετά από τη θανάτωση. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1.

Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, στέλεχος, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διαίτα, κλπ.

— συνθήκες του πειράματος:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης:

περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε θάλαμο δοκιμασίας, εφόσον χρησιμοποιηθεί. Πρέπει επίσης να περιγραφεί ο εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, όπου χρειάζεται, της σταθερότητας συγκέντρωσης αεροζόλ ή μεγέθους σωματιδίων.

Δεδομένα έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία:

Τα δεδομένα αυτά πρέπει να συνοψισθούν με μορφή πίνακα και να παρουσιαστούν με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή διακύμανση), και πρέπει να περιλαμβάνουν:

- α) ταχύτητες ροής του αέρα διαμέσου της συσκευής εισπνοής·
- β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα·
- γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που εισάγεται στη συσκευή εισπνοής, διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα)·
- δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε·
- ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στη ζώνη αναπνοής της δοκιμασίας·
- ζ) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),

- επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,
- δεδομένα συχνότητας εμφάνισης όγκων ανά φύλο, δόση και τύπο όγκου,
- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
- δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση,
- περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,
- χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
- στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,
- αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων,
- ευρήματα νεκροψίας,
- λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 33

ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΧΡΟΝΙΑΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Ο στόχος μιας συνδυασμένης μελέτης χρόνιας τοξικότητας/καρκινογενετικότητας είναι να προσδιορίσει τις χρόνιες και καρκινογενετικές επιδράσεις μιας ουσίας πάνω σε ένα θηλαστικό είδος ζώου μετά από παρατεταμένη έκθεση. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, η μελέτη καρκινογενετικότητας υποβοηθείται από μία τουλάχιστον δορυφορική ομάδα αγωγής και μία δορυφορική ομάδα μάρτυρα. Η δόση που χρησιμοποιείται για τη δορυφορική ομάδα υψηλής δόσης μπορεί να είναι υψηλότερη από εκείνη που χρησιμοποιείται για την ομάδα υψηλής δόσης στη μελέτη καρκινογενετικότητας. Τα ζώα στη μελέτη καρκινογενετικότητας εξετάζονται για γενική τοξικότητα καθώς επίσης και για αντίδραση στην καρκινογένεση. Τα ζώα στη δορυφορική ομάδα αγωγής εξετάζονται για γενική τοξικότητα.

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται κανονικά επτά ημέρες την εβδομάδα, μέσω κατάλληλης οδού, σε διάφορες ομάδες πειραματόζωων (μία δόση ανά ομάδα), κατά το μεγαλύτερο μέρος της διάρκειας της ζωής τους. Κατά τη διάρκεια της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία και έπειτα από αυτήν, τα πειραματόζωα παρατηρούνται καθημερινά για την ανίχνευση σημείων τοξικότητας και την ανάπτυξη όγκων.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Τα ζώα διατηρούνται κάτω από πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται στις απαιτούμενες ομάδες αγωγής και μάρτυρες.

Πειραματόζωα

Το προτιμώμενο είδος είναι ο αρουραίος. Με βάση τα αποτελέσματα μελετών που έχουν διεξαχθεί κατά το παρελθόν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη ζώων (τροκτικά ή μη τροκτικά). Πρέπει να χρησιμοποιούνται νέα υγιή ζώα από τα στελέχη που συνήθως χρησιμοποιούνται για εργαστηριακές μελέτες, και οι δόσεις πρέπει να αρχίζουν το συντομότερο δυνατόν μετά από τον απογαλακτισμό.

Στην αρχή της μελέτης η διαφορά βάρους μεταξύ των ζώων που χρησιμοποιούνται δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ της μέσης τιμής. Στην περίπτωση που έχει διεξαχθεί μελέτη υποχρόνιας τοξικότητας για να χρησιμεύσει σαν προκαταρκτική σε μια μακροπρόθεσμη μελέτη, πρέπει να χρησιμοποιηθούν και για τις δύο μελέτες τα ίδια είδη και ποικιλίες.

Αριθμός και φύλο

Πρέπει να χρησιμοποιηθούν 100 τουλάχιστον ζώα (50 θηλυκά και 50 αρσενικά) σε κάθε επίπεδο δόσης και συμπτύσσουσα ομάδα μάρτυρα. Τα θηλυκά πρέπει να είναι άτοκα και όχι έγκυα. Εάν έχουν προγραμματιστεί θανατώσεις κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, ο αριθμός των ζώων πρέπει να αυξηθεί ανάλογα με τον αριθμό των ζώων που πρόκειται να θανατωθούν πριν από την ολοκλήρωση της μελέτης.

Η δορυφορική ομάδα ή ομάδες αγωγής για την εκτίμηση των παθολογικών επιδράσεων, εκτός των όγκων, πρέπει να περιλαμβάνουν 20 ζώα από κάθε φύλο, ενώ η δορυφορική ομάδα μάρτυρα πρέπει να περιλαμβάνει 10 ζώα από κάθε φύλο.

Επίπεδα δόσεων

Για τους σκοπούς της δοκιμασίας καρκινογενετικότητας, εκτός από τη συμπράττουσα ομάδα μάρτυρα πρέπει να χρησιμοποιηθούν τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να είναι αρκετά υψηλό για να προκαλέσει σημεία ελάχιστης τοξικότητας, όπως είναι η ελαφρή ύφεση στην απόκτηση βάρους του σώματος (λιγότερο από 10%), χωρίς να μεταβάλλει αισθητά την κανονική διάρκεια ζωής λόγω επιδράσεων που δεν σχετίζονται με όγκους.

Το χαμηλότερο επίπεδο δόσης δεν πρέπει να προκαλεί επιπλοκές στην κανονική ανάπτυξη, εξέλιξη και μακροβιότητα του ζώου ή να παράγει οποιαδήποτε ένδειξη τοξικότητας. Γενικά, δεν πρέπει να είναι χαμηλότερη από 10% από την υψηλή δόση.

Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να ορισθούν σε ένα μέσο επίπεδο μεταξύ των υψηλής και χαμηλής δόσης.

Κατά την επιλογή των επιπέδων δόσεων, πρέπει να ληφθούν υπόψη δεδομένα από προηγούμενο και μελέτες τοξικότητας.

Για τους σκοπούς της δοκιμασίας της χρόνιας τοξικότητας συμπεριλαμβάνονται στη μελέτη πρόσθετες ομάδες αγωγής και μία συμπράττουσα δορυφορική ομάδα μάρτυρας. Η υψηλή δόση για τα ζώα της δορυφορικής ομάδας που υφίστανται την αγωγή πρέπει να επιλεγεί κατά τρόπο ώστε να μην προκαλεί σαφή τοξικότητα.

Η συχνότητα έκθεσης είναι κανονικά καθημερινή. Εάν η χημική ουσία χορηγείται στο πόσιμο νερό ή αναμειγνύεται στο διαιτολόγιο πρέπει να είναι συνεχώς διαθέσιμη.

Ομάδες μάρτυρες

Πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια συμπράττουσα ομάδα, τελείως όμοια από κάθε άποψη με τις εκτιθέμενες ομάδες, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία.

Σε ειδικές περιπτώσεις, όπως είναι οι μελέτες τοξικότητας, στις οποίες η ουσία λαμβάνεται με την εισπνοή και αφορά αεροζόλ ή τη χρήση γαλακτοματοποιητικού μέσου μη χαρακτηρισμένης βιολογικής δράσης σε μελέτες τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το στόμα, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια πρόσθετη ομάδα μάρτυρας που δεν θα εκτίθεται στο έκδοχο.

Οδός λήψης

Οι τρεις κύριες οδοί λήψης είναι από το στόμα, από το δέρμα και με την εισπνοή. Η επιλογή της οδού λήψης εξαρτάται από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά της δοκιμαζόμενης ουσίας και από την πιθανή μορφή της έκθεσης του ανθρώπου σ' αυτήν.

Μελέτες τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το στόμα

Όταν η δοκιμαζόμενη ουσία απορροφάται από τη γαστρεντερική οδό, και εφόσον η στοματική οδός είναι μία από τις οδούς από την οποία μπορούν να εκτεθούν οι άνθρωποι, τότε χρησιμοποιείται αυτή, εφόσον δεν υπάρχουν αντενδείξεις. Τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν τη δοκιμαζόμενη ουσία στη διαίτά τους, διαλυμένη σε πόσιμο νερό, ή μέσα σε κάψουλες.

Στην ιδανικότερη περίπτωση οι δόσεις χορηγούνται επί επτά ημέρες την εβδομάδα, επειδή η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα επιτρέπει την ανάληψη από την τοξικότητα ή την υποχώρησή της κατά την περίοδο που δεν χορηγούνται δόσεις, και έτσι επηρεάζει το αποτέλεσμα και τη μετέπειτα αξιολόγηση. Ωστόσο, από πρακτική κυρίως άποψη, η χορήγηση δόσεων επί πέντε ημέρες την εβδομάδα θεωρείται σαν αποδεκτή.

Δοκιμασίες τοξικότητας με λήψη της ουσίας από το δέρμα

Η δερματική έκθεση με την επάλειψη του δέρματος μπορεί να επιλεγεί για την απομίμηση μιας κύριας οδού ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία και σαν ένα πρότυπο σύστημα για την πρόκληση βλαβών στο δέρμα.

Δοκιμασίες τοξικότητας με λήψη της ουσίας με την εισπνοή

Επειδή οι μελέτες αυτές παρουσιάζουν πιο περίπλοκα τεχνικά προβλήματα απ' ό,τι οι μελέτες με άλλες οδούς χορήγησης, δίδονται εδώ λεπτομερέστερες οδηγίες γι' αυτόν τον τρόπο χορήγησης. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η ενδοτραχειακή ενστάλαξη μπορεί να αποτελέσει μια καλή εναλλακτική λύση σε ιδιαίτερες καταστάσεις.

Οι μακροπρόθεσμες εκθέσεις σχεδιάζονται συνήθως με βάση υφιστάμενη προοπτική ανθρώπινης έκθεσης στην ουσία, εκθέτοντας τα ζώα καθημερινά επί έξι ώρες, μετά από την εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων του θαλάμιου, επί πέντε ημέρες την εβδομάδα (διαλείπουσα έκθεση), ή, σε ενδεχόμενη έκθεση περιβάλλοντος, 22 έως 24 ώρες έκθεσης κάθε ημέρα επί επτά ημέρες την εβδομάδα (συνεχής έκθεση), με μία ώρα περίπου την ημέρα για τη διατροφή των ζώων σε παραπλήσια ώρα και για συντήρηση του θαλάμιου. Και στις δύο περιπτώσεις τα ζώα εκτίθενται συνήθως σε καθορισμένη συγκέντρωση δοκιμαζόμενης ουσίας. Μια βασική διαφορά που πρέπει να ληφθεί υπόψη μεταξύ διαλείπουσας και συνεχούς έκθεσης είναι ότι στην πρώτη υπάρχει μια δεκαεπτάωρη μέχρι δεκαοκτώωρη περίοδος κατά την οποία τα ζώα μπορεί να αναλάβουν από τις επιδράσεις της κάθε καθημερινής έκθεσης καθώς επίσης και μία ακόμη μεγαλύτερη περίοδος ανάληψης κατά τα σαββατοκύριακα.

Η επιλογή της διαλείπουσας ή της συνεχούς έκθεσης εξαρτάται από τους στόχους της μελέτης και από την ανθρώπινη έκθεση στην ουσία που πρέπει να απομνηθεί. Παρ' όλα αυτά πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένες τεχνικές δυσκολίες. Επί παραδείγματι, τα πλεονεκτήματα της συνεχούς έκθεσης για την απομνηψη συνθηκών περιβάλλοντος μπορεί να αντισταθμιστούν από την ανάγκη χορήγησης νερού και τροφής κατά τη διάρκεια της έκθεσης και από την ανάγκη περισσότερο περίπλοκων (και αξιόπιστων) τεχνικών παραγωγής και συνεχούς παρακολούθησης με μέτρηση αεροζόλ και ατμών.

Θάλαμοι έκθεσης

Τα ζώα πρέπει να δοκιμάζονται σε θαλάμους εισπνοής που είναι σχεδιασμένοι να υφίστανται δυναμική ροή δώδεκα τουλάχιστον αλλαγών αέρα ανά ώρα ώστε να διασφαλίζεται επαρκής περιεκτικότητα σε οξυγόνο και ομοιόμορφα κατανεμημένη ατμόσφαιρα έκθεσης στην ουσία. Οι θάλαμοι μάρτυρες και έκθεσης πρέπει να είναι τελείως όμοιοι στην κατασκευή και στη σχεδίαση ώστε να εξασφαλίζουν συνθήκες έκθεσης συγκρίσιμες απ' όλες τις απόψεις, με εξαίρεση την έκθεση στη δοκιμαζόμενη ουσία. Μια ελαφρή αρνητική πίεση μέσα στο θάλαμο διατηρείται συνήθως για την πρόληψη διαρροής της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γύρω χώρο. Οι θάλαμοι πρέπει να ελαχιστοποιούν το συνολισμό των πειραματόζωων. Σαν γενικός κανόνας για την εξασφάλιση της σταθερότητας της ατμόσφαιρας του θαλάμου πρέπει να οριστεί ότι ο συνολικός όγκος των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβίνει το 5 % του όγκου του θαλάμου.

Πρέπει να διενεργούνται οι παρακάτω μετρήσεις ή έλεγχοι:

- i) Ροή αέρα: η ταχύτητα ροής του αέρα διά μέσου του θαλάμου πρέπει κατά προτίμηση να παρακολουθείται συνεχώς.
- ii) Συγκέντρωση: κατά τη διάρκεια της περιόδου της καθημερινής έκθεσης, η συγκέντρωση δεν πρέπει να αποκλίνει περισσότερο από $\pm 15\%$ από τη μέση τιμή. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, οι καθημερινές συγκεντρώσεις πρέπει να διατηρούνται όσο το δυνατό σταθερές.
- iii) Θερμοκρασία και υγρασία: για τα θρωκτικά, η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται στους $22 \pm 2^\circ\text{C}$ και η υγρασία μέσα στο θάλαμο σε 30 έως 70%, εκτός από τις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται νερό για την ενυδάρωση της δοκιμαζόμενης ουσίας στην ατμόσφαιρα του θαλάμου. Κατά προτίμηση, τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία πρέπει να παρακολουθούνται και να μετρούνται συνεχώς.
- iv) Μετρήσεις μεγέθους σωματιδίων: στην ατμόσφαιρα του θαλάμου πρέπει να γίνεται προσδιορισμός της κατανομής μεγέθους σωματιδίων στα υγρά ή στερεά αεροζόλ. Τα σωματίδια αεροζόλ πρέπει να είναι αναπνεύσιμου μεγέθους για το χρησιμοποιούμενο πειραματόζωο. Δείγματα ατμόσφαιρας θαλάμου πρέπει να λαμβάνονται στη ζώνη αναπνοής των ζώων. Το δείγμα αέρα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικό της κατανομής των σωματιδίων στα οποία εκτίθενται τα ζώα και πρέπει να αντιπροσωπεύει, επί σταθμικής βάσης, όλο το εναερόζωο αεροζόλ, ακόμη και όταν μεγάλη ποσότητα από το αεροζόλ δεν είναι αναπνεύσιμη. Οι αναλύσεις μεγέθους πρέπει να διεξάγονται συχνά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του συστήματος παραγωγής σωματιδίων ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα του αεροζόλ, και μετέπειτα, κατά τη διάρκεια των εκθέσεων, μόνον εφόσον παρίσταται ανάγκη, για τον προσδιορισμό της ομοιομορφίας στην κατανομή σωματιδίων στα οποία εκτέθηκαν τα ζώα.

Διάρκεια της μελέτης

Η διάρκεια μιας μελέτης καρκινογενετικότητας καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της κανονικής διάρκειας ζωής των πειραματόζωων. Η μελέτη πρέπει να τερματίζεται στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρινητούς και στους 24 μήνες για τους αρουραίους. Ωστόσο, για ορισμένα στελέχη ζώων με μεγαλύτερη μακροβιότητα ή/και χαμηλό βαθμό αυτογενών όγκων, η μελέτη πρέπει να ολοκληρώνεται στους 24 μήνες για τους ποντικούς και τους κρινητούς και στους 30 μήνες για τους αρουραίους. Εναλλακτικά, η περάτωση μιας τέτοιας εκτεταμένης μελέτης είναι αποδεκτή όταν ο αριθμός των επιζώντων ζώων στην ομάδα χαμηλότερης δόσης ή στην ομάδα μάρτυρα φθάνει το 25%. Όταν τελειώσει μια μελέτη στην οποία υπάρχει έκδηλη διαφορά αντίδρασης κατά φύλο, κάθε φύλο πρέπει να θεωρηθεί σαν αντικείμενο χωριστής μελέτης. Στην περίπτωση που μόνο η ομάδα υψηλής δόσης πεθαίνει πρόωρα από προφανείς αιτίες τοξικότητας, δεν χρειάζεται να περατωθεί η μελέτη, υπό την προϋπόθεση ότι οι τοξικολογικές εκδηλώσεις δεν προκαλούν προβλήματα στις άλλες ομάδες. Για να γίνει αποδεκτό ένα αρνητικό πειραματικό αποτέλεσμα, δεν πρέπει να χαθούν από τη δοκιμασία πάνω από 10% των μελών οποιασδήποτε ομάδας λόγω αυτόλυσης των ιστών, κανιβαλισμού ή προβλημάτων διαχείρισης, και τα επιζώντα ζώα απ' όλες τις ομάδες να μην είναι λιγότερα από το 50% στους 18 μήνες για τους ποντικούς και τους κρινητούς, και στους 24 μήνες για τους αρουραίους.

Οι δορυφορικές ομάδες 20 ζώων ανά φύλο που λαμβάνουν δόσεις και τα 10 ζώα μάρτυρες ανά φύλο για τη δοκιμασία χρόνιας τοξικότητας πρέπει να διατηρηθούν στη μελέτη για δώδεκα τουλάχιστον μήνες. Τα ζώα αυτά πρέπει να προγραμματισθούν για θανάτωση, για την εξέταση της παθολογικής κατάστασης σχετικά με τη δοκιμαζόμενη ουσία, στην οποία παθολογική κατάσταση, δεν εμπλέκονται γηριατρικές μεταβολές.

Διαδικασία

Παρατηρήσεις

Πρέπει να διενεργούνται καθημερινές παρατηρήσεις «κλωβού» που πρέπει να περιλαμβάνουν τις μεταβολές στο δέρμα και στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους υμένες, καθώς επίσης και στο αναπνευστικό, κυκλοφορικό, αυτόνομο και κεντρικό νευρικό σύστημα, στη σωματοκινητική δραστηριότητα και στο πρότυπο συμπεριφοράς.

Πρέπει να διενεργείται κλινική εξέταση σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα στα ζώα της δορυφορικής ομάδας (ομάδων) που υφίστανται την αγωγή.

Η τακτική παρατήρηση των ζώων είναι αναγκαία για την το κατά μέγιστο δυνατόν εξασφάλιση της μη απολείας ζώων από τη δοκιμασία, οφειλομένη σε αιτίες όπως είναι ο κανθαλιζμός, η αυτόλυση των ιστών ή η εσφαλμένη τοποθέτηση. Εφόσον παρατηρούνται ετοιμοθάνατα ζώα, πρέπει να απομακρύνονται και να υφίστανται νεκροψία.

Πρέπει να καταγράφονται οι κλινικές ενδείξεις, συμπεριλαμβανομένων των νευρολογικών και οφθαλμολογικών μεταβολών, καθώς επίσης και η θνησιμότητα για όλα τα ζώα. Ειδική προσοχή πρέπει να δοθεί στην ανάπτυξη όγκων. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος προσβολής, το σημείο προσβολής, οι διαστάσεις, η εμφάνιση και η εξέλιξη κάθε μακροσκοπικά ορατού ή ψηλαφητού όγκου. Πρέπει να καταγράφεται ο χρόνος εμφάνισης και εξέλιξης των τοξικών συνθηκών.

Πρέπει να γίνονται μετρήσεις για την κατανάλωση τροφής (και την κατανάλωση νερού όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό) κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της μελέτης και μετέπειτα κατά τρίμηνα περίπου διαστήματα εκτός αν η κατάσταση της υγείας ή οι μεταβολές στο βάρος του σώματος υπαγορεύουν τη λήψη άλλων μέτρων.

Το βάρος του σώματος πρέπει να καταγράφεται χωριστά για όλα τα ζώα μία φορά την εβδομάδα κατά τη διάρκεια των 13 πρώτων εβδομάδων της περιόδου της δοκιμασίας και μετέπειτα μία φορά τουλάχιστον κάθε τέσσερις εβδομάδες.

Κλινικές εξετάσεις

Αιματολογική εξέταση

Αιματολογική εξέταση (π.χ. περιεκτικότητα σε αιμοσφαίρινη, όγκος συσσωρευμένων κυττάρων, συνολικός αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, συνολικός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, αιματοπετάλια ή άλλες μετρήσεις της πηκτικής ικανότητας του αίματος) πρέπει να διενεργείται στους τρεις μήνες, έξι μήνες, και μετέπειτα κατά διαστήματα έξι μηνών καθός επίσης και κατά το τέλος της δοκιμασίας σε δείγματα αίματος που λήφθηκαν από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες. Εάν είναι δυνατόν, οι αιμοληψίες πρέπει να γίνουν στους ίδιους αρουραίους σε κάθε ένα από τα παραπάνω αναφερθέντα χρονικά διαστήματα.

Εάν οι παρατηρήσεις «κλωβού» δείχνουν επιδείνωση της υγείας των ζώων κατά τη διάρκεια της μελέτης, πρέπει να διενεργηθεί διαφορετική μέτρηση του αίματος των προσβληθέντων ζώων. Η διαφορετική μέτρηση του αίματος διενεργείται στα δείγματα των ζώων εκείνων που ανήκουν στην ομάδα υψηλότερης δόσης και στις ομάδες μάρτυρες. Οι διαφορετικές μετρήσεις αίματος διενεργούνται για την επόμενη κατά σειρά ομάδα ή ομάδες χαμηλότερης δόσης, μόνον εάν υπάρχει βασική διαφορά μεταξύ της ομάδας υψηλότερης δόσης και των ομάδων ελέγχου ή εάν ενδείκνυται από τα παθολογικά ευρήματα.

Ανάλυση ούρων

Δείγματα ούρων από 10 αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες (εάν είναι δυνατό από τους ίδιους αρουραίους και κατά τα ίδια χρονικά διαστήματα όπως αναφέρθηκε παραπάνω στις αιματολογικές εξετάσεις), θα πρέπει να συγκεντρώνονται για ανάλυση. Οι παρακάτω προσδιορισμοί πρέπει να γίνονται είτε σε μεμονωμένα ζώα είτε σε συγχωνευμένο δείγμα ανά φύλο ανά ομάδα τρωκτικών:

- εμφάνιση: όγκος και πυκνότητα για τα μεμονωμένα ζώα,
- πρωτεΐνη, γλυκόζη, κετόνες, λανθάνουσα αιμορραγία (ημιοσοτικά), και
- μικροσκοπική εξέταση ιζήματος (ημιοσοτικά).

Κλινική χημική ανάλυση

Κατά διαστήματα έξι μηνών περίπου και στο τέλος της μελέτης, λαμβάνονται δείγματα αίματος για κλινικές χημικές μετρήσεις από όλα τα μη τρωκτικά και από δέκα αρουραίους ανά φύλο από όλες τις ομάδες (αν είναι δυνατόν, από του ίδιους αρουραίους σε κάθε χρονικό διάστημα). Επίσης, θα πρέπει να ληφθεί ένα προπαρασκευασμένο δείγμα από τα μη τρωκτικά. Παρασκευάζεται πλάσμα από τα δείγματα αυτά και γίνονται οι παρακάτω προσδιορισμοί:

- συγκέντρωση συνολικής πρωτεΐνης,
- συγκέντρωση αλβουμίνης,
- δοκιμασίες λειτουργίας ήπατος (όπως είναι η δράση της αλκαλικής φωσφατάσης, της γλουταμινικής πυροσταφυλικής τρανσαμινάσης (1) και της γλουταμινικής οξαλοξικής τρανσαμινάσης (2) η γ-γλουταμυλο-τρανσπεπτιδάση και η αποκαρβοξυλάση της ορνιθίνης,
- ο μεταβολισμός των υδατανθράκων, όπως είναι η νηστεία γλυκόζης αίματος,
- δοκιμασίες λειτουργίας νεφρού, όπως είναι το άζωτο ουρίας του αίματος.

(1) Γνωστή τώρα σαν αμινοτρανσφεράση της αλανίνης στον ορό.

(2) Γνωστή τώρα σαν ασπαραγική αμινοτρανσφεράση στον ορό.

Μακροσκοπική νεκρωσία

Όλα τα ζώα πρέπει να υποστούν πλήρη μακροσκοπική νεκρωσία, που θα περιλαμβάνει και εκείνα που πέθαναν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ή εκείνα που θανατώθηκαν σε ετοιμοθάνατη κατάσταση. Πριν από τη θανάτωση όλων των ζώων, πρέπει να ληφθούν δείγματα αίματος από όλα τα ζώα για διαφορετικού τύπου μέτρηση του αιματός. Όλες οι μακροσκοπικά ορατές βλάβες, οι όγκοι ή οι βλάβες που προκαλούν υποψία όγκων, πρέπει να διατηρηθούν. Θα πρέπει να γίνει προσπάθεια για τη συσχέτιση των μακροσκοπικών παρατηρήσεων με τα μικροσκοπικά ευρήματα.

Όλα τα όργανα και ιστοί πρέπει να διατηρηθούν για ιστοπαθολογική εξέταση. Αυτή συνήθως αφορά τα παρακάτω όργανα και ιστούς: τον εγκέφαλο (μυελό/γέφυρα, παρεγκεφαλικό και εγκεφαλικό φλοιό), την υπόφυση, το θυρεοειδή (συμπεριλαμβανομένου του παραθυρεοειδούς), το θύμο, τους πνεύμονες (συμπεριλαμβανομένης της τραχείας), την αορτή, τους σιελογόνους αδένες, το ήπαρ, τη σπλήνα, τους νεφρούς (1), τα επινεφρίδια (1), τον οισοφάγο, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο, τη νηστίδα, τον ειλέο, το τυφλό έντερο, το κόλον, το ορθό έντερο, τη μήτρα, την ουροδόχο κύστη, τους λεμφαδένες, το πάγκρεας, τους γεννητικούς αδένες (1), τα βοηθητικά γεννητικά όργανα, το μαστικό αδένα θήλαος (1), το δέρμα, το μυϊκό σύστημα, το περιφερικό νεύρο, το νωτιαίο μυελό (αυχενικό, μεσοθωρακικό και οσφυϊκό), το στέρνο με μυελό οστών και το μηριαίο οστό (συμπεριλαμβανομένης της άρθρωσης) και τους οφθαλμούς.

Παρ' όλο ότι η διόγκωση των πνευμόνων και της ουροδόχου κύστης με μία σταθεροποιητική ουσία αποτελεί τον καλύτερο τρόπο για τη διατήρηση των ιστών αυτών, η διόγκωση των πνευμόνων σε μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή είναι απαραίτητη για κατάλληλη ιστοπαθολογική εξέταση. Σε ειδικές μελέτες, όπως είναι οι μελέτες με λήψη της ουσίας με εισπνοή, ολόκληρη η αναπνευστική οδός πρέπει να μελετηθεί, συμπεριλαμβανομένης της ρινός, του φάρυγγα και του λάρυγγα.

Εάν διεξαχθούν άλλες κλινικές εξετάσεις, οι πληροφορίες που θα ληφθούν από τις διαδικασίες αυτές πρέπει να είναι διαθέσιμες πριν από τη μικροσκοπική εξέταση, επειδή μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό μέσο καθοδήγησης για τον παθολόγο.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Για το τμήμα της δοκιμασίας που αφορά τη χρόνια τοξικότητα:

Πρέπει να διενεργηθεί λεπτομερής εξέταση όλων των διατηρημένων οργάνων όλων των ζώων της δορυφορικής ομάδας υψηλής δόσης και των ομάδων μάρτυρων. Όπου βρεθεί παθολογική επίδραση στη δορυφορική ομάδα υψηλής δόσης που έχει σχέση με τη δοκιμαζόμενη ουσία, τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των ζώων σε όλες τις δορυφορικές ομάδες αγωγής πρέπει να υποβληθούν σε πλήρη λεπτομερή ιστολογική εξέταση, καθώς επίσης και εκείνα των ομάδων αγωγής, στο τμήμα εκείνο της μελέτης που αφορά την καρκινογενετικότητα, κατά την περάτωσή της.

Για το τμήμα της δοκιμασίας που αφορά την καρκινογένεση:

- a) Πλήρης ιστοπαθολογική εξέταση πρέπει να διεξαχθεί σε όλα τα όργανα και ιστούς όλων των ζώων που πεθάνουν ή θανατώνονται κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και σε όλα τα ζώα στις ομάδες μάρτυρες και υψηλής δόσης.
- β) Όλοι οι μακροσκοπικά ορατοί όγκοι ή βλάβες σε οποιοδήποτε όργανο, που προκαλούν υποψία ότι είναι όγκοι σε όλες τις ομάδες, πρέπει να εξετασθούν.
- γ) Εάν υπάρχει σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης νεοπλασματικών βλαβών ανάμεσα στην ομάδα υψηλότερης δόσης και στην ομάδα μάρτυρα, πρέπει να διεξαχθεί ιστοπαθολογική εξέταση στο συγκεκριμένο όργανο ή ιστό και στις άλλες ομάδες.
- δ) Εάν τα επίζοντα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης είναι αισθητά λιγότερα από εκείνα της ομάδας μάρτυρα, τότε η επόμενη κατά σειρά ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.
- ε) Εάν υπάρχουν ενδείξεις στην ομάδα υψηλής δόσης για επαγωγή τοξικών ή άλλων επιδράσεων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν μια νεοπλασματική αντίδραση, η επόμενη κατά σειρά ομάδα χαμηλότερης δόσης πρέπει να υποστεί πλήρη εξέταση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, παρουσιάζοντας για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των ζώων που παρουσίασαν όγκους ή τοξικές επιδράσεις που διαπιστώθηκαν κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, το χρόνο διαπίστωσης και τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν να έχουν όγκους μετά τη θανάτωση. Όλα τα παρατηρούμενα αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

— είδος ζώου, στέλεχος, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, διαίτα κλπ.,

(1) Τα όργανα αυτά, από δέκα ζώα ανά φύλο ανά ομάδα για τα τροκτικά, θα πρέπει να ζυγιστούν.

- συνθήκες του πειράματος:

Περιγραφή της συσκευής έκθεσης:

Περιλαμβάνει το σχέδιο, τον τύπο, τις διαστάσεις, την πηγή αέρα, το σύστημα παραγωγής σωματιδίων και αεροζόλ, τη μέθοδο κλιματισμού, την επεξεργασία του εξερχόμενου αέρα και τη μέθοδο στέγασης των ζώων σε θάλαμο δοκιμασίας, εφόσον χρησιμοποιηθεί. Πρέπει επίσης να περιγραφεί ο εξοπλισμός για τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της υγρασίας και, εφόσον χρειάζεται, της σταθερότητας της συγκέντρωσης αεροζόλ ή μεγθους σωματιδίων.

Δεδομένα της έκθεσης στη δοκιμαζόμενη ουσία:

Τα δεδομένα αυτά πρέπει να συνοψισθούν με μορφή πίνακα και να παρουσιαστούν με μέσες τιμές και ένα μέτρο διακύμανσης (π.χ. σταθερή διακύμανση), και πρέπει να περιλαμβάνουν:

- α) ταχύτητες ροής του αέρα διαμέσου της συσκευής εισπνοής·
 - β) θερμοκρασία και υγρασία του αέρα·
 - γ) ονομαστικές συγκεντρώσεις (συνολική ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας που τροφοδοτείται στη συσκευή εισπνοής, διαιρούμενη με τον όγκο του αέρα·
 - δ) φύση του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε·
 - ε) πραγματικές συγκεντρώσεις στη ζώνη αναπνοής της δοκιμασίας·
 - ς) μέσα μεγέθη σωματιδίων (εφόσον χρειάζεται),
- επίπεδα δόσεων (συμπεριλαμβανομένου του εκδόχου, εάν χρησιμοποιήθηκε) και συγκεντρώσεις,
 - συχνότητα εμφάνισης όγκων ανά φύλο, δόση και τύπο όγκου,
 - χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, εάν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης (συμπεριλαμβανομένης και της δορυφορικής ομάδας),
 - στοιχεία τοξικών αντιδράσεων ανά φύλο και δόση,
 - περιγραφή τοξικών ή άλλων επιδράσεων,
 - χρόνο παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
 - οφθαλμολογικά ευρήματα,
 - στοιχεία για την τροφή και το βάρος του σώματος,
 - αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων,
 - αποτελέσματα κλινικών βιοχημικών εξετάσεων (συμπεριλαμβανομένης τυχόν ανάλυσης ούρων),
 - ευρήματα νεκροψίας,
 - λεπτομερή περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
 - στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και περιγραφή των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν,
 - συζήτηση των αποτελεσμάτων,
 - ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 34

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε κλιμακωτά αυξανόμενες δόσεις σε αρκετές ομάδες αρσενικών και θηλυκών ζώων. Τα αρσενικά πρέπει να λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και για ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο περίπου (56 ημέρες για τον ποντικό και 70 ημέρες για τον αρουραίο), έτσι ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στη σπερματογένεση από τη δοκιμαζόμενη ουσία.

Τα θηλυκά της γενεάς Γ (Γ = γονείς) πρέπει να λαμβάνουν δόσεις επί δύο τουλάχιστον πλήρεις κύκλους οργασμού ώστε να προκληθούν επιπλοκές στον οργασμό από τη δοκιμαζόμενη ουσία. Κατόπιν, τα ζώα ζευγαρώνονται. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια της περιόδου του ζευγαρώματος και μετέπειτα μόνο στα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και κατά τη διάρκεια της περιόδου της γαλουχίας.

Για τη λήψη της ουσίας με την εισπνοή, η μέθοδος αυτή θα απαιτήσει τροποποιήσεις.

1.5. Ποιοτικά κριτήρια

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προπαρασκευή

Πριν από δοκιμασία, υγιή νεαρά ζώα πλήρους ανάπτυξης ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Τα ζώα διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από το πείραμα.

Συνιστάται η δοκιμαζόμενη ουσία να χορηγείται μέσα στη διαίτα ή στο πόσιμο νερό. Άλλες οδοί λήψης είναι επίσης αποδεκτές. Όλα τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν τις δόσεις τους με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια της σχετικής περιόδου του πειράματος. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλα πρόσθετα για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν προκαλούν τοξικές επιδράσεις. Η χορήγηση δόσεων θα γίνεται επί επτά ημέρες την εβδομάδα.

Πειραματόζωα

Επιλογή του είδους

Ο αρουραίος ή ο ποντικός είναι το προτιμώμενο είδος. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται είδη ζώων με χαμηλή γονιμότητα παρά μόνο υγιή ζώα που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειραματικές διαδικασίες. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, στέλεχος, φύλο, βάρος ή/και ηλικία.

Για μια επαρκή εκτίμηση της γονιμότητας, πρέπει να μελετηθούν τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά. Όλα τα ζώα που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και τα ζώα μάρτυρες, πρέπει να απογαλακτισθούν πριν από την έναρξη χορήγησης των δόσεων.

Αριθμός και φύλο

Κάθε ομάδα ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή, καθώς επίσης και των ζώων μάρτυρων πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ζώων που να αποδίδει 20 περίπου έγκυα θηλυκά σε περίοδο τοκετού ή που να μην απέχουν πολύ από την περίοδο αυτή. Αυτό έχει σαν σκοπό να δημιουργηθούν αρκετές εγκυμοσύνες και απόγονοι για την εξασφάλιση μιας ουσιαστικής αξιολόγησης της ικανότητας της ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην εγκυμοσύνη και στη μητρική συμπεριφορά στα ζώα της γενεάς Γ, καθώς επίσης και στον θηλασμό, στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη των απογόνων (Α 1) (Α 1 = απόγονοι πρώτης γενεάς) από τη σύλληψη ως τον απογαλακτισμό.

Συνθήκες δοκιμασίας

Η τροφή και το νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Όταν πλησιάζει η περίοδος του τοκετού, τα έγκυα θηλυκά πρέπει να τοποθετούνται χωριστά σε ειδικά κλουβιά τοκετού, και μπορούν να τους παρέχονται υλικά κατασκευής φωλιάς.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, η ομάδα μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει το έκδοχο στην ποσότητα που χρησιμοποιείται στο υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εάν μια δοκιμαζόμενη ουσία προκαλεί μειωμένη διαιτητική λήψη ή χρήση, τότε πιθανό να θεωρηθεί αναγκαία η χρησιμοποίηση μιας ομάδας μάρτυρα διατροφής κατά ζεύγη. Το καλύτερο είναι, εάν το υψηλότερο επίπεδο δόσης δεν περιοριστεί από τη φυσικοχημική φύση ή τις βιολογικές επιδράσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας, να προκαλεί τοξικότητα αλλά όχι θνησιμότητα στους γονείς (Γ). Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να προκαλούν ελάχιστες τοξικές επιδράσεις, που να μπορούν να αποδοθούν στην δοκιμαζόμενη ουσία, και η χαμηλή δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί οποιαδήποτε παρατηρήσιμες επιπλοκές στους γονείς ή στους απογόνους. Όταν χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή κάψουλα, η δόση κάθε ζώου πρέπει να βασίζεται στο ιδιαίτερο βάρος του σώματος κάθε ζώου και να προσαρμόζεται κάθε εβδομάδα ανάλογα με τις μεταβολές του βάρους του σώματος. Για τα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι δόσεις μπορούν να βασίζονται στο βάρος του σώματος κατά την ημέρα 0 ή 6 της εγκυμοσύνης, εφόσον αυτό είναι επιθυμητό.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσίας χαμηλής τοξικότητας, εάν ένα επίπεδο δόσης 1000 mg/kg τουλάχιστον δεν παράγει οποιαδήποτε ένδειξη επιπλοκής στην αναπαραγωγική λειτουργία, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες. Εάν μία προκαταρκτική μελέτη σε υψηλό επίπεδο δόσης, με σαφείς ενδείξεις μητρικής τοξικότητας, δεν παρουσιάζει επιπλοκές στη γονιμότητα, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν ότι δεν είναι αναγκαίες.

Εκτέλεση της δοκιμασίας

Πειραματικά προγράμματα

Η καθημερινή χορήγηση δόσης στους αρσενικούς γονείς (Γ) πρέπει να αρχίσει όταν έχουν ηλικία πέντε έως εννέα εβδομάδων περίπου, αφού ήδη έχουν απογαλακτισθεί και εγκλιματισθεί επί πέντε τουλάχιστον ημέρες. Στους αρουραίους, η χορήγηση δόσεων συνεχίζεται επί δέκα εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος (για τους ποικίλους οκτώ εβδομάδες). Τα αρσενικά θα πρέπει να θανατωθούν και να εξετασθούν είτε στο τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος ή, εναλλακτικά, μπορούν να διατηρηθούν με πειραματική διαίτα για την ενδεχόμενη παραγωγή δεύτερης ομάδας νεογνών και να θανατωθούν και να εξετασθούν σε κάποιο χρονικό σημείο πριν από το τέλος της μελέτης. Για τους θηλυκούς γονείς (Γ), η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει πέντε ημέρες τουλάχιστον μετά τον εγκλιματισμό, και να συνεχίζεται επί δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από το ζευγάρωμα. Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στα θηλυκά (Γ) πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη την περίοδο ζευγαρώματος των τριών εβδομάδων, κατά την περίοδο εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των απογόνων (Α1). Πρέπει να ληφθούν υπόψη οι τροποποιήσεις του προγράμματος χορήγησης δόσεων με βάση άλλες διαθέσιμες πληροφορίες για τη δοκιμαζόμενη ουσία, όπως είναι η επαγωγή μεταβολισμού ή βιοσυσσώρευσης.

Διαδικασία ζευγαρώματος

Στις μελέτες τοξικότητας αναπαραγωγής μπορούν να εφαρμοσθούν είτε ζευγαρώματα τύπου 1/1 (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό) ή 1/2 (ένα αρσενικό προς δύο θηλυκά).

Με βάση τον τύπο ζευγαρώματος 1/1, ένα θηλυκό πρέπει να τοποθετηθεί με το ίδιο αρσενικό μέχρι ότου επέλθει η εγκυμοσύνη ή μέχρις ότου περάσουν τρεις εβδομάδες. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή βδομάτος από πηγμένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Η ημέρα 0 της εγκυμοσύνης ορίζεται, λαμβανομένης υπόψη της σπερματογένεσης, σαν ημέρα της ανεύρεσης πηγμένου σπέρματος ή σπέρματος.

Τα ζευγάρια εκείνα που δεν ζευγαρώνουν, πρέπει να εξετασθούν για να προσδιοριστεί η αιτία της φαινομενικής στειρότητας. Στην έρευνα αυτή περιλαμβάνονται διαδικασίες, όπως είναι η παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλους αποδεδειγμένους πατέρες ή μητέρες, η μικροσκοπική εξέταση των αναπαραγωγικών οργάνων και η εξέταση του κύκλου οργασμού ή της σπερματογένεσης.

Αριθμός νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα

Τα ζώα που λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης γονιμότητας επιτρέπεται να γεννήσουν κανονικά και να μεγαλώσουν τα παιδιά τους μέχρι το στάδιο του απογαλακτισμού χωρίς ιδιαίτερη προτυποποίηση των νεογνών.

Εάν ακολουθηθεί η προτυποποίηση, προτείνεται η παρακάτω διαδικασία:

Μεταξύ της πρώτης και της τέταρτης ημέρας μετά τη γέννηση, ο αριθμός των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα μπορεί να διορθωθεί με την αφαίρεση των πλεονάζοντων νεογνών με επιλογή, έτσι ώστε να δημιουργηθούν όσο το δυνατόν πλησιέστερα τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ανά ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα. Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την ύπαρξη τεσσάρων νεογνών ανά φύλο σε κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, είναι αποδεκτή η μερική διάρθρωση (π.χ. 5 αρσενικά και 3 θηλυκά). Δεν γίνονται δεκτές διορθώσεις για ομάδες νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα και που περιλαμβάνουν λιγότερα από οκτώ νεογνά.

Παρατηρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμασίας, κάθε ζώο πρέπει να παρατηρείται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και όλα τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρισμα και κατά το ζευγάρισμα, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται κάθε εβδομάδα. Μετά τον τοκετό, και κατά τη διάρκεια του θηλασμού, πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις κατανάλωσης τροφής καθώς επίσης και κατανάλωσης νερού, όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται μέσα στο πόσιμο νερό, την ίδια ημέρα με τη ζύγιση των ομάδων νεογνών κάθε μητέρας. Οι αρσενικοί και θηλυκοί γονείς (Γ) θα πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης δόσεων και μετέπειτα κάθε εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις πρέπει να καταγράφονται χωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

Η διάρκεια κύησης πρέπει να υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατόν μετά τη γέννηση για να βρεθεί ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, ο αριθμός των θνησιγενών, ο αριθμός των ζωντανών και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών.

Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώθηκαν την τέταρτη ημέρα πρέπει να διατηρηθούν και να μελετηθούν για ενδεχόμενα ελαττώματα. Τα ζωντανά νεογνά θα πρέπει να μετρηθούν και οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα να ζυγιαστούν το επόμενο πρωί μετά τη γέννησή τους, καθώς επίσης την τέταρτη και έβδομη ημέρα, και μετέπειτα κάθε εβδομάδα μέχρι το τέλος της μελέτης, οπότε τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται χωριστά. Πρέπει να καταγράφονται οι φυσικές ανωμαλίες ή οι ανωμαλίες συμπεριφοράς που παρατηρούνται στις μητέρες ή στους απογόνους.

Παθολογική εξέταση

Νεκρωσία

Κατά το χρόνο της θανάτωσης ή του θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ζώα της γενιάς Γ θα πρέπει να εξετάζονται μακροσκοπικά για οποιεσδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές, με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεκρά ή ετοιμοθάνατα νεογνά θα πρέπει να εξετάζονται για ελαττώματα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Οι ωοθήκες, η μήτρα, ο τράχηλος, ο κόλπος, οι όρχις, η επιδιδυμίδα, η σπερματοδόχος κύστη, ο προστάτης, ο πηκτικός αδένας, η υπόφυση και τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των ζώων της γενιάς Γ, πρέπει να διατηρηθούν για μικροσκοπική εξέταση. Στη σπάνια περίπτωση που τα όργανα αυτά δεν έχουν εξετασθεί σε άλλες μελέτες πολλαπλών δόσεων, πρέπει να εξετασθούν μικροσκοπικά σε όλα τα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης και ομάδας μάρτυρα και, εφόσον είναι δυνατόν, στα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα όργανα που παρουσιάζουν ανωμαλίες στα ζώα αυτά πρέπει εν συνεχεία να εξετασθούν σε όλα τα ζώα της γενιάς Γ. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να γίνει μικροσκοπική εξέταση σε όλους τους ιστούς που παρουσιάζουν μακροσκοπικές παθολογικές μεταβολές. Όπως προτάθηκε στις διαδικασίες ζευγαρώματος, τα αναπαραγωγικά όργανα των ζώων που είναι ύποπτα στειρότητας, μπορεί να υποβληθούν σε μικροσκοπική εξέταση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα δεδομένα μπορούν να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των γόνιμων αρσενικών, τον αριθμό των έγκυων θηλυκών, τον τύπο των μεταβολών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο μεταβολής. Εφόσον είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει επίσης να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος/ποικιλία ζώου που χρησιμοποιήθηκε,
- δεδομένα τοξικής αντίδρασης ανά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένης της γονιμότητας, κυοφορίας και βιωσιμότητας,

- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, αν τα ζώα επέζησαν, χρόνο προγραμματισμένης θανάτωσης για τον τερματισμό της μελέτης,
- πίνακα που παρουσιάζει το βάρος κάθε ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα, το μέσο βάρος νεογνών, και το ατομικό βάρος των νεογνών κατά το τέλος της μελέτης,
- τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στην ανάπτυξη μετά τη γέννηση κλπ.,
- ημέρα παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
- στοιχεία βάρους του σώματος για τα ζώα της γενεάς Γ,
- ευρήματα νεκροψίας,
- λεπτομερή περιγραφή των μικροσκοπικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον χρειάζεται,
- σύζηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 35

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΔΥΟ ΓΕΝΕΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμασίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται σε κλιμακωτές δόσεις σε αρκετές ομάδες θηλικών και αρσενικών ζώων. Τα αρσενικά της γενεάς Γ μπορούν να λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και επί ένα τουλάχιστον πλήρη σπερματογενετικό κύκλο (περίπου 56 ημέρες για τον ποντικό και 70 ημέρες για τον αρουραίο) ούτως ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στη σπερματογένεση από την δοκιμαζόμενη ουσία. Τα θηλυκά της γενεάς Γ πρέπει να λαμβάνουν δόσεις επί δύο τουλάχιστον πλήρεις κύκλους οργασμού έτσι ώστε να προκληθούν τυχόν επιπλοκές στον οργασμό από τη δοκιμαζόμενη ουσία. Τα ζώα εν συνεχεία ζευγαρώνονται. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται και στα δύο φύλα κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος και εν συνεχεία μόνο στα θηλυκά κατά τη διάρκεια της κήσεως και της γαλουχίας. Μετά τον απογαλακτισμό, η χορήγηση της ουσίας συνεχίζεται στους απογόνους (A₁) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μέχρι την ενηλικίωση, κατά το ζευγάρισμα και την παραγωγή μιας γενεάς A₂ μέχρι τον απογαλακτισμό της γενεάς A₂. Για τη λήψη της δοκιμαζόμενης ουσίας με την εισπνοή, η μέθοδος θα απαιτήσει τροποποιήσεις.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμασίας

Προπαρασκευή

Πριν από το πείραμα, υγιή ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και κατανέμονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Οι γονείς (Γ) διατηρούνται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες κατοικίας και διατροφής επί πέντε τουλάχιστον ημέρες πριν από τη δοκιμασία.

Συνστάται η δοκιμαζόμενη ουσία να χορηγείται μέσα στη διαίτα ή στο πόσιμο νερό. Άλλες οδοί χορήγησης είναι επίσης αποδεκτές. Όλα τα ζώα πρέπει να λαμβάνουν δόσεις με την ίδια μέθοδο κατά τη διάρκεια ολόκληρης της πειραματικής περιόδου. Εάν χρησιμοποιηθεί έκδοχο ή άλλο πρόσθετο για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, πρέπει να είναι γνωστό ότι δεν παράγει τοξικές επιδράσεις. Η χορήγηση των δόσεων θα πρέπει να διενεργείται επί επτά ημέρες την εβδομάδα.

Πειραματόζωα: επιλογή του είδους

Ο αρουραίος ή ο ποντικός είναι το προτιμώμενο είδος. Πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα της γενεάς Γ που δεν έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε πειραματικές διαδικασίες. Δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται στέλεχη με χαμηλή γονιμότητα. Τα πειραματόζωα θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, το στέλεχος, το φύλο, το βάρος ή/και την ηλικία.

Για μια επαρκή εκτίμηση της γονιμότητας, πρέπει να μελετηθούν τόσο τα αρσενικά όσο και τα θηλυκά ζώα. Όλα τα δοκιμαζόμενα ζώα και τα ζώα μάρτυρες πρέπει να απογαλακτισθούν πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων.

Αριθμός και φύλο

Κάθε ομάδα αγωγής και κάθε ομάδα μάρτυρας πρέπει να περιλαμβάνει επαρκή αριθμό ζώων που να αποδίδει 20 περίπου έγκυα θηλυκά σε περίοδο τοκετού ή που να μην απέχουν πολύ από την περίοδο αυτή. Αυτό έχει σαν σκοπό να δημιουργηθούν αρκετές εγκυμοσύνες και απόγονοι έτσι ώστε να εξασφαλισθεί μία ουσιαστική εκτίμηση της

ικανότητας της ουσίας να επιδρά πάνω στη γονιμότητα, εγκυμοσύνη και μητρική συμπεριφορά καθώς επίσης και στο θηλασμό, την ανάπτυξη και εξέλιξη των απογόνων (A1) από τη στιγμή της σύλληψης ως την ωριμότητα, και από την ανάπτυξη των απογόνων τους (A2) ως τον απογαλακτισμό.

Συνθήκες δοκιμασίας

Η τροφή και το νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Όταν πλησιάζει ο χρόνος του τοκετού, τα έγκυα θηλυκά ζώα θα πρέπει να τοποθετούνται χωριστά σε ειδικά κλουβιά τοκετού και μπορεί να τους παρέχονται υλικά κατασκευής φωλιάς.

Επίπεδα δόσεων

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τρεις τουλάχιστον ομάδες αγωγής και μία ομάδα μάρτυρας. Εάν χρησιμοποιείται έκδοχο για τη χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας, η ομάδα μάρτυρας πρέπει να λαμβάνει το έκδοχο στην ποσότητα που χρησιμοποιείται στο υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εάν μία δοκιμαζόμενη ουσία προκαλέσει μειωμένη διαιτητική λήψη ή χρήση, τότε η χρησιμοποίηση μιας ομάδας μάρτυρα συνδυασμένης διατροφής πρέπει να θεωρείται αναγκαία. Το ιδανικό είναι εάν το υψηλότερο επίπεδο δόσης δεν περιορίζεται από τη φυσική/χημική φύση ή τις βιολογικές επιδράσεις της δοκιμαζόμενης ουσίας, να προκαλεί τοξικότητα αλλά όχι θνησιμότητα στους γονείς (Γ). Η ενδιάμεση δόση ή δόσεις πρέπει να προκαλούν ελάχιστες επιδράσεις, που να μπορούν να αποδοθούν στην δοκιμαζόμενη ουσία, και η χαμηλή δόση δεν πρέπει να παράγει οποιεσδήποτε παρατηρήσιμες επιπλοκές στους γονείς ή στους απογόνους. Όταν χορηγείται με καθετήρα στομάχου ή κάψουλα, η δόση που λαμβάνει κάθε ζώο θα πρέπει να βασίζεται στο ιδιαίτερο βάρος του σώματος κάθε ζώου και να προσαρμόζεται κάθε εβδομάδα. Για τα θηλυκά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η χορήγηση δόσεων πρέπει να βασίζεται στο βάρος του σώματος κατά την ημέρα 0 ή 6 της εγκυμοσύνης, εφόσον είναι αυτό επιθυμητό.

Οριακή δοκιμασία

Στην περίπτωση ουσιών με χαμηλή τοξικότητα, εάν ένα επίπεδο δόσης 1 000 mm/kg τουλάχιστον δεν παράγει οποιαδήποτε στοιχεία επιπλοκής στην αναπαραγωγική λειτουργία, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να μη θεωρηθούν αναγκαίες. Εάν μία προκαταρκτική μελέτη στο υψηλό επίπεδο δόσης, με σαφείς ενδείξεις μητρικής τοξικότητας, δεν παρουσιάζει επιπλοκές στη γονιμότητα, οι μελέτες σε άλλα επίπεδα δόσεων μπορούν να μη θεωρηθούν αναγκαίες.

Εκτέλεση της διαδικασίας

Πειραματικά προγράμματα

Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στους αρσενικούς γονείς (Γ) πρέπει να αρχίσει όταν έχουν ηλικία πέντε έως ενnea εβδομάδες, αφού ήδη έχουν απογαλακτισθεί και εγκλιματισθεί επί πέντε τουλάχιστον ημέρες. Στους αρουραίους, η χορήγηση δόσεων συνεχίζεται επί 10 εβδομάδες πριν από την περίοδο του ζευγαρώματος (για τους ποντικούς οκτώ εβδομάδες). Τα αρσενικά πρέπει να θανατωθούν και να εξετασθούν είτε στο τέλος της περιόδου του ζευγαρώματος, ή, εναλλακτικά, μπορούν να διατηρηθούν με πειραματική διαίτα για την ενδεχόμενη παραγωγή μιας δεύτερης ομάδας νεογνών και να θανατωθούν και να εξετασθούν σε κάποιο χρονικό σημείο πριν από το τέλος της μελέτης.

Για τους θηλυκούς γονείς (Γ), η χορήγηση δόσεων πρέπει να αρχίζει πέντε ημέρες τουλάχιστον μετά τον εγκλιματισμό και να συνεχίζεται επί δύο εβδομάδες τουλάχιστον πριν από το ζευγάρωμα. Η καθημερινή χορήγηση δόσεων στα θηλυκά (Γ) πρέπει να συνεχίζεται καθ' όλη την περίοδο ζευγαρώματος των τριών εβδομάδων, κατά την περίοδο εγκυμοσύνης και μέχρι τον απογαλακτισμό των απογόνων (A₁). Πρέπει να ληφθούν υπόψη οι τροποποιήσεις του προγράμματος χορήγησης δόσεων με βάση τις διαθέσιμες πληροφορίες για τη δοκιμαζόμενη ουσία, όπως είναι το συμπέρασμα για τον μεταβολισμό της ή τη βιοσυσσωρευση. Η χορήγηση δόσεων στα ζώα της ομάδας (A₁) αρχίζει κατά τον απογαλακτισμό και τελειώνει με τη θανάτωσή τους.

Διαδικασία ζευγαρώματος

Στις μελέτες τοξικότητας αναπαραγωγής μπορούν να εφαρμοσθούν είτε ζευγάρωμα τύπου 1/1 (ένα αρσενικό προς ένα θηλυκό) ή 1/2 (ένα αρσενικό προς δύο θηλυκά).

Με βάση τον τύπο ζευγαρώματος 1/1, ένα θηλυκό πρέπει να τοποθετηθεί με το ίδιο αρσενικό μέχρις ότου επέλθει η εγκυμοσύνη ή μέχρις ότου περάσουν τρεις εβδομάδες. Κάθε πρωί, τα θηλυκά πρέπει να εξετάζονται για την παρουσία σπέρματος ή βύσματος από πτημένο σπέρμα μέσα στον κόλπο. Η ημέρα 0 της εγκυμοσύνης ορίζεται σαν ημέρα της ανεύρεσης πτημένου σπέρματος ή σπέρματος. Λαμβανομένης υπόψη της σπερματογένεσης, οι απόγονοι (A₁) δεν πρέπει να ζευγαρωθούν μέχρι να φθάσουν σε ηλικία τουλάχιστον των έντεκα εβδομάδων για τους ποντικούς και των 13 εβδομάδων για τους αρουραίους. Για το ζευγάρωμα των απογόνων (A₁) γίνεται τυχαία επιλογή ενός αρσενικού και ενός θηλυκού από κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, για διασταύρωση με ένα νεογνό μιας άλλης ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από άλλη μητέρα που ανήκει στην ίδια ομάδα δόσεων, για την παραγωγή μιας γενιάς A₂. Τα αρσενικά και τα θηλυκά της γενιάς A₁ που δεν επιλέγησαν για ζευγάρωμα θανατώνονται κατά τον απογαλακτισμό.

Τα ζευγάρια εκείνα που δεν ζευγαρώνουν πρέπει να εξετασθούν για να προσδιορισθεί η αιτία της φαινομενικής στειρότητας. Στην έρευνα αυτή περιλαμβάνονται διαδικασίες όπως παροχή πρόσθετων ευκαιριών για ζευγάρωμα με άλλους αποδειγμένους πατέρες ή μητέρες και μικροσκοπική εξέταση των αναπαραγωγικών οργάνων και η εξέταση του κύκλου οργασμού ή της σπερματογένεσης.

Αριθμός νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα

Τα ζώα που λαμβάνουν δόσεις κατά τη διάρκεια της μελέτης γονιμότητας επιτρέπεται να γεννήσουν κανονικά και να μεγαλώσουν τα παιδιά τους μέχρι το στάδιο του απογαλακτισμού χωρίς ιδιαίτερη προτυποποίηση των νεογνών.

Εάν ακολουθηθεί η προτυποποίηση, προτείνεται η παρακάτω διαδικασία:

Μεταξύ της πρώτης και τέταρτης ημέρας μετά τη γέννηση, ο αριθμός των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα μπορεί να διορθωθεί με την αφαίρεση των πλεονάζοντων νεογνών με επιλογή, έτσι ώστε να δημιουργηθούν όσο δυνατόν πλησιέστερα τέσσερα αρσενικά και τέσσερα θηλυκά ανά ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα. Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την ύπαρξη τεσσάρων νεογνών ανά φύλο σε κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα, είναι αποδεκτή η μερική διόρθωση (π.χ. 5 αρσενικά και 3 θηλυκά). Δεν γίνονται δεκτές διορθώσεις για ομάδες νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα και που περιλαμβάνουν λιγότερα από οκτώ νεογνά. Η διόρθωση των ομάδων νεογνών (A₂) από τις ίδιες μητέρες γίνεται κατά τον ίδιο τρόπο.

Παρατηρήσεις

Καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου δοκιμίας, κάθε ζώο πρέπει να παρατηρείται τουλάχιστον μία φορά την ημέρα. Σχετικές μεταβολές στη συμπεριφορά, σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και άλλα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας, πρέπει να καταγράφονται. Κατά τη διάρκεια των περιόδων πριν από το ζευγάρωμα και κατά το ζευγάρωμα, η κατανάλωση τροφής πρέπει να μετράται κάθε εβδομάδα. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η κατανάλωση τροφής μπορεί να μετράται προαιρετικά κάθε μέρα. Μετά τον τοκετό, και κατά τη διάρκεια του θηλασμού, πρέπει να διενεργούνται μετρήσεις κατανάλωσης τροφής την ίδια μέρα με τη ζύγιση των ομάδων νεογνών κάθε μητέρας. Οι αρσενικοί και θηλυκοί γονείς (Γ και Α₁) πρέπει να ζυγίζονται κατά την πρώτη ημέρα της χορήγησης δόσεων και μετέπειτα κάθε εβδομάδα. Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να καταγράφονται χωριστά για κάθε ενήλικο ζώο.

Η διάρκεια κύησης πρέπει να υπολογίζεται από την ημέρα 0 της εγκυμοσύνης. Κάθε ομάδα νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τη γέννηση, για να βρεθεί ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, ο αριθμός των θνησιγώνων, ο αριθμός των ζωντανών και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών.

Τα νεκρά νεογνά και τα νεογνά που θανατώθηκαν την τέταρτη ημέρα πρέπει να διατηρηθούν και να μελετηθούν για ενδεχόμενα ελαττώματα. Τα ζωντανά νεογνά πρέπει να μετρηθούν και οι ομάδες των νεογνών που γεννήθηκαν από την ίδια μητέρα να ζυγιστούν το επόμενο πρωί μετά τη γέννηση καθώς επίσης και την τέταρτη και έβδομη ημέρα, και μετέπειτα κάθε εβδομάδα μέχρι το τέλος της μελέτης, οπότε τα ζώα πρέπει να ζυγίζονται χωριστά. Πρέπει να καταγράφονται οι φυσικές ανωμαλίες ή οι ανωμαλίες συμπεριφοράς που παρατηρούνται στις μητέρες ή στους απογόνους.

Παθολογική εξέταση

Νεκροψία

Όλα τα ενήλικα ζώα των γενεών Γ και Α₁ πρέπει να θανατωθούν όταν πλέον δεν χρειάζονται για την εκτίμηση των αναπαραγωγικών επιδράσεων. Οι απόγονοι της γενεάς Α₁ που δεν επιλέγησαν για ζευγάρωμα και όλοι οι απόγονοι της γενεάς Α₂ πρέπει να θανατωθούν μετά τον απογαλακτισμό.

Κατά το χρόνο της θανάτωσης ή του θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης, τα ζώα των γενεών Γ και Α₁ πρέπει να εξετάζονται μικροσκοπικά για οποιοδήποτε δομικές ανωμαλίες ή παθολογικές μεταβολές, με ιδιαίτερη έμφαση στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεκρά ή ετοιμοθάνατα νεογνά πρέπει να εξετάζονται για ελαττώματα.

Ιστοπαθολογική εξέταση

Οι ωοθήκες, η μήτρα, ο τράχηλος, ο κόλπος, οι όρχεις, η επιδιδυμίδα, η σπερματοδόχος κύστη, ο προστάτης, ο πικτικός αδένας, η υπόφυση και τα όργανα που αποτελούν αντικείμενο της μελέτης όλων των επιλεγέντων για ζευγάρωμα ζώων των γενεών Γ και Α₁ πρέπει να διατηρηθούν, εφόσον χρειάζεται, για μικροσκοπική εξέταση. Στη σπάνια περίπτωση που τα όργανα αυτά δεν έχουν εξετασθεί σε άλλες μελέτες πολλαπλών δόσεων, πρέπει να εξετασθούν μικροσκοπικά σε όλα τα ζώα (Γ και Α₁) των ομάδων υψηλής δόσης και ελέγχου και, εφόσον είναι δυνατόν, στα ζώα που πεθαίνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Τα όργανα που παρουσιάζουν ανωμαλίες στα ζώα αυτά πρέπει εν συνεχεία να εξετασθούν στα ζώα των άλλων ομάδων δόσεων. Στις περιπτώσεις αυτές, πρέπει να γίνει μικροσκοπική εξέταση σε όλους τους ιστούς που παρουσιάζουν μακροσκοπικές παθολογικές μεταβολές. Όπως προτάθηκε στις διαδικασίες ζευγαρώματος, τα αναπαραγωγικά όργανα των ζώων που είναι ύποπτα στειρότητας, μπορούν να υποβληθούν σε μικροσκοπική εξέταση.

2. **ΔΕΔΟΜΕΝΑ**

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Τα δεδομένα μπορούν να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα, που παρουσιάζει για κάθε ομάδα δοκιμασίας τον αριθμό των ζώων κατά την αρχή της δοκιμασίας, τον αριθμό των έγκυων ζώων, τον τύπο των μεταβολών και το ποσοστό των ζώων ανά τύπο μεταβολής. Εφόσον είναι δυνατόν, τα αριθμητικά αποτελέσματα πρέπει να εκτιμούνται με κατάλληλη στατιστική μέθοδο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε αναγνωρισμένη στατιστική μέθοδος.

3. **ΣΥΝΤΑΣΗ ΕΚΘΕΣΗΣ**

3.1. **Έκθεση της δοκιμασίας**

Η έκθεση του πειράματος πρέπει επίσης να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος/στέλεχος ζώου που χρησιμοποιήθηκε,
- δεδομένα τοξικής αντίδρασης κατά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων δεικτών γονιμότητας, κυοφορίας και βιωσιμότητας,
- χρόνο θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή, αν τα ζώα επέζησαν, χρόνο λήξης της μελέτης,
- πίνακα που παρουσιάζει το βάρος κάθε ομάδας νεογνών που γεννήθηκαν από κάθε μητέρα, το μέσο βάρος των νεογνών, και το ατομικό βάρος των νεογνών κατά το τέλος της μελέτης,
- τοξικές ή άλλες επιδράσεις, στην αναπαραγωγή, στους απογόνους, στην ανάπτυξη μετά τη γέννηση κλπ.,
- ημέρα παρατήρησης κάθε ανωμαλίας και μετέπειτα πορεία της,
- στοιχεία βάρους του σώματος για τα ζώα των γενεών Γ και Α₁ που επιλέγησαν για ζευγάρισμα,
- ευρήματα νεκρωσίας,
- λεπτομερή περιγραφή όλων των μικροσκοπικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, εφόσον χρειάζεται,
- συζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

B. 36
ΤΟΞΙΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Βλέπε γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Καμία.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμίας

Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από κατάλληλη οδό. Ανάλογα με το σκοπό της μελέτης, η ουσία μπορεί να χορηγηθεί σε μία δόση ή σε επαναλαμβανόμενες δόσεις σε καθορισμένα διαστήματα, σε μία ή περισσότερες ομάδες πειραματοζώων. Έπειτα, ανάλογα με τον τύπο της μελέτης, η ουσία ή/και οι μεταβολίτες προσδιορίζονται στα υγρά του σώματος, στους ιστούς ή/και στα απεκκρίματα. Μελέτες μπορούν να διενεργηθούν με «μη σεσημασμένες» ή «σεσημασμένες» μορφές της δοκιμαζόμενης ουσίας. Όπου χρησιμοποιείται σήμανση, πρέπει να γίνεται στην ουσία κατά τέτοιο τρόπο ώστε να παρέχει τις περισσότερες πληροφορίες για την τύχη της ενώσεως.

1.5. Κριτήρια ποιότητας

Κανένα.

1.6. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμίας

Προπαρασκευή

Υγιή νεαρά ζώα πλήρους ανάπτυξης εγκλιματίζονται στις συνθήκες εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον μέρες πριν από τη δοκιμασία. Πριν από τη δοκιμασία τα ζώα ξεχωρίζονται με τυχαία επιλογή και τοποθετούνται σε ομάδες αγωγής. Σε ειδικές περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν πολύ νεαρά, έγκυα ζώα ή ζώα τα οποία έχουν υποστεί προηγούμενη αγωγή.

Συνθήκες δοκιμίας

Πειραματόζωα

Οι μελέτες τοξικοκινητικής μπορούν να διεξαχθούν σε ένα ή περισσότερα κατάλληλα είδη ζώων και πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν ή που υπάρχει πρόθεση να χρησιμοποιηθούν σε άλλες τοξικολογικές μελέτες πάνω στην ίδια δοκιμαζόμενη ουσία. Όταν σε μια δοκιμασία χρησιμοποιούνται τρωκτικά, η διαφορά βάρους δεν πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους.

Αριθμός και φύλο

Για μελέτες απορρόφησης και απέκκρισης, πρέπει αρχικά να υπάρχουν τέσσερα ζώα σε κάθε ομάδα δόσης. Η προτίμηση του φύλου δεν είναι επιτακτική, αλλά κάτω από ορισμένες περιστάσεις πιθανόν να χρειάζεται η μελέτη και των δύο φύλων. Εάν τα δύο γένη αντιδρούν διαφορετικά, τότε πρέπει να δοκιμαστούν τέσσερα ζώα από κάθε φύλο. Στην περίπτωση μελετών με ζώα μη τρωκτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί μικρότερος αριθμός ζώων.

Όταν μελετάται η ιστολογική κατανομή, για το αρχικό μέγεθος της ομάδας πρέπει να ληφθούν υπόψη τόσο ο αριθμός των ζώων που θα θανατωθούν σε κάθε χρονικό σημείο όσο και ο αριθμός των χρονικών σημείων που θα εξεταστούν. Όταν μελετάται ο μεταβολισμός, το μέγεθος της ομάδας σχετίζεται με τις ανάγκες της μελέτης.

Για μελέτες πολλαπλής δόσης καθώς επίσης και για μελέτες πολλαπλών χρονικών σημείων, για το μέγεθος της ομάδας πρέπει να ληφθεί υπόψη ο αριθμός των χρονικών σημείων και των σχεδιαζόμενων θανατώσεων. Η ομάδα δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να περιέχει λιγότερα από δύο ζώα. Το μέγεθος της ομάδας πρέπει να είναι αρκετό για να παρέχει επακριβή προσδιορισμό πρόσληψης, του plateau και της απόληξης (ανάλογα) της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών.

Επίπεδα δόσεων

Στην περίπτωση χορήγησης μιας και μόνο δόσης πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο τουλάχιστον επίπεδα δόσεων. Πρέπει να υπάρχει μία χαμηλή δόση, στην οποία δεν παρατηρούνται καθόλου τοξικές επιδράσεις, και μία υψηλή δόση, στην οποία μπορούν να υπάρξουν μεταβολές στις τοξικοκινητικές παραμέτρους ή στην οποία συμβαίνουν τοξικές επιδράσεις.

Στην περίπτωση χορήγησης επαναλαμβανόμενων δόσεων η χαμηλή δόση είναι συνήθως επαρκής, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί επίσης να χρειάζεται μια υψηλή δόση.

Οδός χορήγησης

Οι τοξικοκινητικές μελέτες πρέπει να εκτελούνται με τη χρησιμοποίηση της ίδιας οδού και, όπου είναι δυνατόν, του ίδιου εκδόχου με το έκδοχο που χρησιμοποιήθηκε ή που υπάρχει πρόθεση να χρησιμοποιηθεί σε άλλες μελέτες τοξικότητας. Η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα με καθετήρα στομάχου ή μέσα στην τροφή, επιτίθεται στο δέρμα, ή χορηγείται με εισπνοή σε καθορισμένα διαστήματα σε ομάδες πειραματόζώων. Η ενδοφλέβια χορήγηση της δοκιμαζόμενης ουσίας μπορεί να είναι χρήσιμη για τον καθορισμό της σχετικής απορρόφησης από άλλες οδούς. Επιπλέον, χρήσιμες πληροφορίες μπορούν να εξαχθούν για τον τρόπο κατανομής αμέσως μετά την ενδοφλέβια χορήγηση μιας ουσίας.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανότητα επίδρασης του εκδόχου πάνω στην δοκιμαζόμενη ουσία. Πρέπει να δοθεί προσοχή στις διαφορές απορρόφησης μεταξύ της χορήγησης των δοκιμαζόμενων ουσιών με καθετήρα στομάχου και με τροφή, καθώς επίσης και στην ανάγκη για έναν ακριβή καθορισμό της δόσης, ιδιαίτερα όταν η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται με την τροφή.

Περίοδος παρατήρησης

Όλα τα ζώα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και να καταγράφονται όλα τα σημεία τοξικότητας καθώς επίσης και άλλα σχετικά κλινικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του χρόνου εμφάνισης, του βαθμού και της διάρκειας.

Διαδικασία

Μετά τη ζύγιση των πειραματοζώων, η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από κατάλληλη οδό. Εάν θεωρηθεί ότι έχει σημασία, είναι δυνατόν η ουσία να χορηγηθεί μετά από νηστεία των πειραματοζώων.

Απορρόφηση

Ο ρυθμός και η έκταση απορρόφησης της χορηγούμενης ουσίας μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση διαφόρων μεθόδων, με ή χωρίς ομάδες αναφοράς⁽¹⁾, π.χ. με:

- τον προσδιορισμό της ποσότητας της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών στα απεκκρίματα, όπως είναι τα ούρα, η χολή, τα κόπρανα, ο εκπνεόμενος αέρας και της ποσότητας που παραμένει στο πτώμα,
- τη σύγκριση της βιολογικής αντίδρασης (π.χ. μελέτες οξείας τοξικότητας) μεταξύ πειραματικών ομάδων και ομάδων μαρτύρων ή/και ομάδων αναφοράς,
- τη σύγκριση της ποσότητας της απεκκρινόμενης ουσίας ή/και του μεταβολίτη από τους νεφρούς στις ομάδες του πειράματος και στις ομάδες αναφοράς,
- τον προσδιορισμό της επιφάνειας που περικλείεται από την καμπύλη επιπέδου πλάσματος-χρόνου της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών και σύγκριση με δεδομένα που προέρχονται από ομάδα αναφοράς.

⁽¹⁾ Στη μέθοδο αυτή, ομάδα αναφοράς είναι η ομάδα εκείνη στην οποία η δοκιμαζόμενη ουσία χορηγείται από μία άλλη οδό που εξασφαλίζει πλήρη διαθεσιμότητα της δόσης.

Κατανομή

Επί του παρόντος υπάρχουν δύο προσεγγίσεις, η μία ή και οι δύο από τις οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση των τρόπων κατανομής:

- χρήσιμες ποιοτικές πληροφορίες λαμβάνονται με τη χρήση τεχνικών μεθόδων αυτοραδιογραφίας ολόκληρου του σώματος,
- ποσοτικές πληροφορίες λαμβάνονται με τη θανάτωση ζώων σε διαφορετικούς χρόνους μετά από έκθεση και καθορισμό της συγκέντρωσης και της ποσότητας της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών στους ιστούς και στα όργανα.

Απέκκριση

Στις μελέτες απέκκρισης, συλλέγονται τα ούρα, τα κόπρανα και ο εκπνεόμενος αέρας και, σε μερικές περιπτώσεις, η χολή.

Η ποσότητα της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών στα απεκκρίματα αυτά πρέπει να μετράται αρκετές φορές μετά την έκθεση, είτε έως ότου να έχει απεκκριθεί το 95 % περίπου της χορηγηθείσας δόσης είτε επί επτά ημέρες, οποιουδήποτε από τα δύο συμβεί πρώτο.

Σε ειδικές περιπτώσεις, η απέκκριση της δοκιμαζόμενης ουσίας στο γάλα πειραματοζώων σε κατάσταση γαλακτοφορίας μπορεί να χρειάζεται εξέταση.

Μεταβολισμός

Για τον καθορισμό της έκτασης και του τρόπου μεταβολισμού πρέπει να υποστούν ανάλυση βιολογικά δείγματα με κατάλληλες τεχνικές μεθόδους. Η δομή των μεταβολιτών πρέπει να διασαφηνισθεί και να προταθούν κατάλληλες οδοί μεταβολισμού όπου υπάρχει ανάγκη να δοθούν απαντήσεις σε ερωτήματα που προκύπτουν από προηγούμενες τοξικολογικές μελέτες. Ίσως να είναι χρήσιμο να εκτελεσθούν μελέτες in vitro για τη λήψη πληροφοριών για τις οδούς μεταβολισμού.

Περαισότερες πληροφορίες για τη σχέση του μεταβολισμού προς την τοξικότητα μπορούν να ληφθούν από βιοχημικές μελέτες, όπως είναι ο καθορισμός των επιδράσεων επί των ενζυματικών συστημάτων μεταβολισμού, η απόληψη ενδογενών μη πρωτεϊνικών σουλφουδριολοενώσεων και η δέσμευση της ουσίας με μακρομόρια.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Σύμφωνα με τον τύπο της εκτελούμενης μελέτης, τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακες που θα συνοδεύονται, όπου χρειάζεται, από γραφικές παραστάσεις. Για κάθε ομάδα του πειράματος πρέπει να αναφέρονται, όπου χρειάζεται, οι μέσες και στατιστικές διαφορές μετρήσεων αναφορικά με το χρόνο, τη χορήγηση δόσεων, τους ιστούς και τα όργανα. Η έκταση της απορρόφησης και η ποσότητα και ο ρυθμός απέκκρισης πρέπει να καθορίζονται με κατάλληλες μεθόδους. Όταν εκτελούνται μελέτες μεταβολισμού, πρέπει να δίνεται η δομή των εξακριβωμένων μεταβολιτών και να παρουσιάζονται οι πιθανές οδοί μεταβολισμού.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

3.1. Έκθεση της δοκιμασίας

Σύμφωνα με τον τύπο της εκτελούμενης μελέτης, η έκθεση της δοκιμασίας πρέπει να περιλαμβάνει τις παρακάτω πληροφορίες:

- είδος ζώου, ποικιλία ζώου, πηγή, συνθήκες περιβάλλοντος, τροφή, κλπ.,
- χαρακτηρισμό σεσημασμένων υλικών, εφόσον χρησιμοποιήθηκαν,
- επίπεδα δόσης και διαστήματα που χρησιμοποιήθηκαν,
- οδό/οδούς χορήγησης και τυχόν έκδοχα που χρησιμοποιήθηκαν,
- τοξικές και άλλες επιδράσεις που παρατηρήθηκαν,
- μεθόδους καθορισμού της δοκιμαζόμενης ουσίας ή/και των μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένου του εκπνεόμενου αέρα,
- αναπαράσταση σε πίνακες των μετρήσεων κατά φύλο, δόση, περιοχή δόσης, χρόνο, ιστούς και όργανα,

- παράταση της έκτασης απορρόφησης και απέκκρισης σε σχέση με το χρόνο,
- μεθόδους για το χαρακτηριστικό και εξακρίβωση μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα,
- μεθόδους βιοχημικών μετρήσεων αναφορικά με το μεταβολισμό,
- προτεινόμενες οδούς μεταβολισμού,
- σύζήτηση των αποτελεσμάτων,
- ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

3.2. **Αξιολόγηση και ερμηνεία**

Βλέπε γενικές πληροφορίες, μέρος Β.

4. **ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ**

Βλέπε γενικές πληροφορίες, μέρος Β.

B.37 ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΑ ΕΚΘΕΣΗ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων των ουσιών, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η ικανότητα ορισμένων κατηγοριών ουσιών να προκαλούν ειδικές μορφές νευροτοξικότητας μη δυνάμενες να ανιχνευθούν με άλλες τοξικολογικές μελέτες. Ορισμένες οργανοφωσφορικές ουσίες οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας πρέπει να θεωρηθούν υποψήφια για μια τέτοια αξιολόγηση.

Για τον εντοπισμό των ουσιών που δύνανται να προκαλέσουν εκ των υστέρων εμφάνιση πολυνευροπάθειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν διερευνητικές δοκιμές *in vitro*. Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δεν αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη ουσία στερείται νευροτοξικής δράσης.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Ως οργανοφωσφορικές ουσίες νοούνται οι χωρίς φορτίο οργανοφωσφορικοί εστέρες, θειοεστέρες ή ανυδρίτες οργανοφωσφορικών, οργανοφωσφονικών, ή οργανοφωσφοραμιδικών οξέων ή ανάλογων φωσφονοθειϊκών, φωσφονοθειϊκών ή φωσφοροθειοαμιδικών οξέων ή άλλες ουσίες δυνάμενες να προκαλέσουν την εκ των υστέρων νευροτοξική επίδραση που παρατηρείται ορισμένες φορές με αυτή την κατηγορία ουσιών.

Ως εκ των υστέρων εμφανιζόμενη νευροτοξικότητα νοείται σύνδρομο το οποίο εκδηλώνεται με παρατεταμένη εκ των υστέρων εμφάνιση αταξίας, περιφερικών αξονοπαθειών του νωτιαίου μυελού και των περιφερικών νεύρων και με αναστολή και γήρανση της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (neuropathy target esterase - NTE).

1.3. Ουσίες αναφοράς

Μια ουσία αναφοράς μπορεί να δοκιμαστεί σε μία θετική ομάδα μάρτυρα προκειμένου να καταδειχθεί ότι η απόκριση των ζώων της δοκιμής δεν μεταβλήθηκε σημαντικά υπό τις εργαστηριακές συνθήκες δοκιμής.

Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη νευροτοξική ουσία είναι το φωσφορικό τρι-ο-τολουόλιο (αριθ. CAS 78-30-8, αριθ. EINECS 201-103-5, ονοματολογία CAS: τρις (2-μεθυλο-φαινυλ)εστέρας του φωσφορικού οξέος) γνωστή επίσης ως τρις-ο-φωσφορικός κρεσυλεστέρας.

1.4. Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μια μόνο δόση από το στόμα σε κατοικίδιες όρνιθες που έχουν προστατευθεί εάν είναι αναγκαίο, από οξείες χολινεργικές επιδράσεις. Τα ζώα παρατηρούνται επί 21 ημέρες για ανωμαλίες στη συμπεριφορά, αταξία και παράλυση, 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση της ουσίας, λαμβάνονται τυχαία ορισμένες όρνιθες από κάθε ομάδα και διενεργούνται βιοχημικές μετρήσεις ιδίως για τον προσδιορισμό της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (NTE). 21 ημέρες μετά την έκθεση, οι υπόλοιπες όρνιθες θανατώνονται και διενεργείται ιστοπαθολογική εξέταση ορισμένων επιλεγμένων νευρικών ιστών.

1.5. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.5.1. Προετοιμασίες

Λαμβάνονται τυχαία υγιείς νεαρές ενήλικες όρνιθες οι οποίες δεν πάσχουν από ιογενείς νόσους, δεν βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή και δεν παρουσιάζουν

ανωμαλίες στο βάδισμα, και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης.

Χρησιμοποιούνται ευρύχωρα κλουβιά, ή περιφράγματα ώστε οι όρνια να μπορούν να κινούνται ελεύθερα και να είναι εύκολη η παρατήρηση του βηματισμού.

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται κανονικά από το στόμα με αναγκαστική θρέψη, ζελατινούχες κάψουλες ή ανάλογη μέθοδο. Οι υγρές ουσίες μπορούν να χορηγούνται χωρίς προηγούμενη αραίωση ή διαλελυμένες σε κατάλληλο φορέα όπως το αραβοσιτέλαιο. Οι στερεές ουσίες πρέπει να διαλύονται, αν είναι δυνατόν, δεδομένου ότι μεγάλες δόσεις στερεών ουσιών σε ζελατινούχες κάψουλες δεν απορροφώνται πάντα ικανοποιητικά. Όταν χρησιμοποιούνται μη υδατικοί φορείς, τα τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά, και, σε αντίθετη περίπτωση, να προσδιορίζονται πριν από τη δοκιμή.

1.5.2. Συνθήκες δοκιμής

1.5.2.1. Πειραματόζωα

Συνιστάται να χρησιμοποιούνται νεαρές ενήλικες κατοικίδιες φωτόκες όρνια (*Gallus gallus domesticus*), ηλικίας 8 έως 12 μηνών, τυποποιημένου μεγέθους, ποικιλίας και φυλής. Οι όρνια πρέπει να έχουν εκτραφεί υπό συνθήκες που επιτρέπουν να κινούνται ελεύθερα.

1.5.2.2. Αριθμός και φύλο

Εκτός από την ομάδα αγωγής, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια ομάδα μάρτυρας στην οποία χορηγείται μόνο φορέας και μία ομάδα θετικού μάρτυρα. Η ομάδα μάρτυρας που λαμβάνει μόνο φορέα πρέπει να υποβάλλεται στην ίδια ακριβώς διαδικασία με την ομάδα αγωγής παραλείποντας όμως τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας.

Ο αριθμός των ζώων που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε ομάδα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η θανάτωση έξι τουλάχιστον ζώων για τη βιοχημική εξέταση (τρία σε καθένα από τα δύο χρονικά σημεία) και η επιβίωση έξι ζώων κατά την περίοδο των 21 ημερών για την παρατήρηση παθολογικών καταστάσεων.

Η ομάδα θετικού μάρτυρα μπορεί να υποβληθεί στη διαδικασία παράλληλα με τις άλλες ομάδες ή να χρησιμοποιηθούν ιστορικά δεδομένα πρόσφατης δοκιμής. Πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον έξι όρνια στις οποίες χορηγείται γνωστή ουσία που προκαλεί εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας, τρεις όρνια για βιοχημική εξέταση και τρεις όρνια για παθολογοανατομική εξέταση. Συνιστάται περιοδική ενημέρωση των δεδομένων του ιστορικού. Όταν το εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή επιφέρει ουσιαστική αλλαγή στον τρόπο διεξαγωγής της (όσον αφορά επί παραδείγματι τη φυλή των ζώων, τη διατροφή τους, τις συνθήκες στέγασης) πρέπει να αναπαράγονται νέα δεδομένα για την ομάδα θετικού μάρτυρα.

1.5.2.3. Επίπεδα δοκιμής

Διεξάγεται προκαταρκτική μελέτη με κατάλληλο αριθμό ζώων και ομάδων επιπέδων δόσης προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο που θα χρησιμοποιηθεί στην κυρίως μελέτη. Στην προκαταρκτική αυτή μελέτη είναι επιδιωκόμενη μερική θνησιμότητα προκειμένου να προσδιοριστεί κατάλληλη δόση για την κυρίως μελέτη. Ωστόσο, για να αποφευχθούν θάνατοι οφειλόμενοι σε οξείες χολινεργικές επιδράσεις, μπορεί να χορηγηθεί ατροπίνη ή άλλος προστατευτικός παράγων γνωστός ότι δεν επηρεάζει την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικών φαινομένων. Για τον υπολογισμό της μέγιστης μη θανατηφόρου δόσης των ελεγχόμενων ουσιών είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διάφορες μέθοδοι (βλ. μέθοδο Β.1α). Ιστορικά δεδομένα για τις όρνια ή άλλα τοξικολογικά στοιχεία μπορούν να είναι επίσης χρήσιμα για την επιλογή της κατάλληλης δόσης.

Το επίπεδο δόσης της ελεγχόμενης ουσίας στην κυρίως μελέτη θα πρέπει να είναι το

υψηλότερο δυνατό λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής μελέτης για την επιλογή της δόσης καθώς και το ανώτερο όριο των 2 000 mg/kg βάρους σώματος. Το ποσοστό θνησιμότητας πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να επιβιώσει επαρκής αριθμός ζώων για τη διεξαγωγή των βιοχημικών (έξι) και ιστολογικών (έξι) εξετάσεων την 21η ημέρα. Για την αποφυγή θανάτων οφειλομένων σε οξείες χολινεργικές επιδράσεις χορηγείται ατροπίνη ή άλλος προστατευτικός παράγων που δεν επηρεάζει τις εκ των υστέρων εμφανιζόμενες νευροτοξικές αντιδράσεις.

1.5.2.4. Οριακή δοκιμή

Εάν μια δοκιμή που έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν οδηγήσει στην παρατήρηση τοξικών εκδηλώσεων και εάν, βάσει των στοιχείων που διατίθενται για ουσίες ανάλογης δομής δεν αναμένεται εμφάνιση τοξικότητας, είναι δυνατόν να μην απαιτείται μελέτη με υψηλότερη δόση. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφ' όσον από την έκθεση του ανθρώπου δεν προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης.

1.5.2.5. Περίοδος παρατήρησης

Η περίοδος παρατήρησης διαρκεί 21 ημέρες.

1.5.3. Διαδικασία

Μετά τη χορήγηση προστατευτικού παράγοντα για την αποφυγή θανάτων οφειλομένων σε οξεία χολινεργική δράση, η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε μία εφ' άπαξ δόση.

1.5.3.1. Γενική παρατήρηση

Η παρατήρηση αρχίζει αμέσως μετά την έκθεση. Όλες οι όρνια παρατηρούνται προσεκτικά πολλές φορές ημερησίως τις 2 πρώτες ημέρες και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μια φορά την ημέρα επί 21 ημέρες ή μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωσή τους. Καταγράφονται όλες οι εκδηλώσεις τοξικότητας καθώς και ο χρόνος ενάρξεως, ο τύπος, η σοβαρότητα και η διάρκεια των παρατηρούμενων ανωμαλιών στη συμπεριφορά. Η αταξία μετράται βάσει τακτικής βαθμολογικής κλίμακας αποτελούμενης από τέσσερις τουλάχιστον διαβαθμίσεις. Σημειώνεται η εμφάνιση παράλυσης. Τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα οι όρνια που έχουν επιλεγεί για την αναζήτηση παθολογικών καταστάσεων απομακρύνονται από τα κλουβιά τους και ακολουθεί περίοδος αναγκαστικής κινητικότητας, όπως το ανέβασμα σκάλας, με σκοπό τη διευκόλυνση της παρατήρησης ανεπαίσθητων τοξικών επιδράσεων. Τα ετοιμοθάνατα ζώα καθώς και εκείνα που παρουσιάζουν δυσφορία ή πόνο πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνει αντιληπτό, να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο και να νεκροτομούνται.

1.5.3.2. Βάρος σώματος

Όλες οι όρνια πρέπει να ζυγίζονται αμέσως πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα.

1.5.3.3. Βιοχημικές εξετάσεις

Επιλέγονται τυχαία έξι όρνια από καθεμία από τις ομάδες αγωγής και μάρτυρα που λαμβάνει μόνο φορέα και τρεις όρνια από την ομάδα θετικού μάρτυρα, και θανατώνονται λίγες ημέρες μετά την έκθεσή τους. Ο εγκέφαλος και ο οσφυϊκός νωτιαίος μυελός προετοιμάζονται και εξετάζονται για την αναστολή της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια. Η εξέταση της αναστολής της εστεράσης αυτής σε ισχιακό νευρικό ιστό μπορεί να είναι επίσης χρήσιμη. Κανονικά, τρία ζώα από την ομάδα μάρτυρα και από καθεμία από τις ομάδες αγωγής θανατώνονται μετά την πάροδο 24 ωρών και τρία ακόμη μετά την πάροδο 48 ωρών, ενώ οι τρεις όρνια από την ομάδα θετικού μάρτυρα θανατώνονται έπειτα από 24 ώρες. Εάν, από την παρατήρηση των κλινικών συμπτωμάτων

δηλητηρίασης (συνήθως τη στιγμή της εμφάνισης των χολινεργικών δράσεων) προκύψει ότι η αποβολή του τοξικού παράγοντα είναι αργή, είναι προτιμότερο να ληφθούν δείγματα ιστών από τρία ζώα σε δύο χρονικές στιγμές μεταξύ 24 και 72 ωρών μετά τη χορήγηση.

Εάν θεωρείται σκόπιμο, στα δείγματα αυτά μπορεί να προσδιοριστεί και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Ωστόσο, μπορεί να συμβεί αυτόματη επαναδραστηριοποίηση της AChE in vivo, και να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της δυνατότητας της ουσίας να δρα ως αναστολέας της AChE.

1.5.3.4. Νεκροψία

Η γενική νεκροψία όλων των ζώων (προγραμματισμένη θανάτωση και θανάτωση ετοιμοθάνατων ζώων) πρέπει να περιλαμβάνει παρατήρηση της όψης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.5.3.5. Ιστοπαθολογική εξέταση

Από τα ζώα που επέζησαν μετά την περίοδο παρατήρησης και δεν χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές μελέτες λαμβάνονται νευρικοί ιστοί και υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση. Οι ιστοί στερεώνονται in situ με τεχνικές έγχυσης.

Λαμβάνονται τομές από την παρεγκεφαλίδα (στο μέσο του διαμήκους άξονα) από τον προμήκη μυελό, τον νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα. Οι τομές νωτιαίου μυελού πρέπει να προέρχονται από την άνω αυχενική μοίρα, τη μεσοθωρακική και την οσφυοϊερή χώρα. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται τομές από την περιφερική περιοχή του κνημιαίου νεύρου και των διακλαδώσεων του στο γαστροκνήμιο μυ καθώς και από το ισχιακό νεύρο. Οι τομές χρώννυνται με κατάλληλες ειδικές για τη μυελίνη και τους νευράξονες χρωστικές.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Κατά κανόνα, αν τα ληφθέντα αποτελέσματα στα τελικά σημεία ελέγχου που επελέγησαν για την παρούσα μέθοδο (βιομηχανικές εξετάσεις, ιστοπαθολογική εξέταση, παρατήρηση της συμπεριφοράς) είναι αρνητικά, δεν απαιτείται συνέχιση των δοκιμών για την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας. Σε περίπτωση όμως που τα αποτελέσματα είναι ασαφή ή αβέβαια μπορεί να απαιτηθεί περαιτέρω αξιολόγηση.

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις, αλλαγές στη συμπεριφορά ή βιοχημικές μεταβολές, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή μεταβολών, το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν τις κάθε τύπου και σοβαρότητας αλλοιώσεις ή μεταβολές.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης πρέπει να αξιολογούνται βάσει της συχνότητας εμφανίσεώς τους, της σοβαρότητας, και της συσχέτισης των επιδράσεων στη συμπεριφορά, των βιοχημικών και ιστοπαθολογικών επιδράσεων καθώς και όλων των άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν στις ομάδες αγωγής και τις ομάδες μάρτυρες. Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους γενικής αποδοχής οι οποίες επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει, εάν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

Για τα πειραματόζωα:

- φυλή,
- αριθμός και ηλικία,
- προέλευση, συνθήκες στέγασης, κ.λπ.,

- βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

- λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια της ελεγχόμενης ουσίας, κατά περίπτωση,
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας,
- λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,
- αιτιολόγηση της επιλογής της δόσης,
- λεπτομερής περιγραφή των δόσεων που χορηγήθηκαν, με στοιχεία για το φορέα, τον όγκο και τη φυσική κατάσταση του χορηγηθέντος προϊόντος,
- ταυτότητα του προστατευτικού παράγοντα που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκε και λεπτομέρειες για τον τρόπο χορήγησής του.

Για τα αποτελέσματα:

- δεδομένα για το βάρος του σώματος,
- δεδομένα για την τοξική αντίδραση ανά ομάδα, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας,
- φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη),
- αναλυτική περιγραφή των βιοχημικών μεθόδων και των ευρημάτων,
- ευρήματα νεκροψίας,
- αναλυτική περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου απαιτείται.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της TG 418 του ΟΟΣΑ.

B.38 ΕΚ ΤΩΝ ΥΣΤΕΡΩΝ ΕΜΦΑΝΙΖΟΜΕΝΗ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΗΣ ΔΟΣΗΣ 28 ΗΜΕΡΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Κατά την εκτίμηση και αξιολόγηση των τοξικών επιδράσεων των ουσιών, είναι σκόπιμο να εξεταστεί η πιθανότητα ορισμένων κατηγοριών ουσιών να προκαλούν ειδικές μορφές νευροτοξικότητας μη δυνάμενες να ανιχνευθούν με άλλες τοξικολογικές μελέτες. Ορισμένες οργανοφωσφορικές ουσίες οι οποίες έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας πρέπει να θεωρηθούν υποψήφιες για μια τέτοια αξιολόγηση.

Για τον εντοπισμό των ουσιών που δύνανται να προκαλέσουν εκ των υστέρων εμφάνιση πολυνευροπάθειας μπορούν να χρησιμοποιηθούν διερευνητικές δοκιμές *in vitro*. Ωστόσο, αρνητικά αποτελέσματα από τις μελέτες αυτές δεν αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη ουσία στερείται νευροτοξικής δράσης.

Η δοκιμή εκ των υστέρων εμφανιζόμενης νευροτοξικής επίδρασης 28 ημερών παρέχει πληροφορίες για τους κινδύνους που είναι δυνατόν να προκύψουν για την υγεία μετά από επανειλημμένη έκθεση για ένα περιορισμένο χρονικό διάστημα. Παρέχει πληροφορίες για τη σχέση δόσης-απόκρισης και εκτίμηση για το επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις, δυνάμενες να χρησιμοποιηθούν στον καθορισμό κριτηρίων ασφαλείας για την έκθεση.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Ως οργανοφωσφορικές ουσίες νοούνται οι χωρίς φορτίο οργανοφωσφορικοί εστέρες, θειοεστέρες ή ανυδρίτες οργανοφωσφορικών οργανοφωσφονικών ή οργανοφωσφοραμιδικών οξέων ή ανάλογων φωσφοροθειϊκών, φωσφονοθειϊκών ή φωσφοροθειοαμιδικών οξέων ή άλλες ουσίες δυνάμενες να προκαλέσουν την εκ υστέρων νευροτοξική επίδραση που παρατηρείται ορισμένες φορές με αυτή την κατηγορία ουσιών.

Ως εκ των υστέρων εμφανιζόμενη νευροτοξικότητα νοείται σύνδρομο το οποίο εκδηλώνεται με παρατεταμένη εκ των υστέρων εμφάνιση αταξίας, περιφερικών αζονοπαθειών του νωτιαίου μυελού και των περιφερικών νεύρων και με αναστολή και γήρανση της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (neuropathy target esterase-NTE).

1.3. Αρχή της μεθόδου

Ημερήσιες δόσεις της ελεγχόμενης ουσίας χορηγούνται από το στόμα σε κατοικίδια όρνιθες επί 28 ημέρες. Τα ζώα παρατηρούνται μια φορά την ημέρα τουλάχιστον, μέχρι την 14η ημέρα μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, για ανωμαλίες στη συμπεριφορά, αταξία και παράλυση. 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, λαμβάνονται τυχαία ορισμένες όρνιθες από κάθε ομάδα και διενεργούνται βιοχημικές μετρήσεις, ιδίως για τον προσδιορισμό της αναστολής της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια (NTE). Δύο εβδομάδες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, οι υπόλοιπες όρνιθες θανατώνονται και διενεργείται ιστοπαθολογική εξέταση επιλεγμένων νευρικών ιστών.

1.4. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.4.1. Προετοιμασίες

Λαμβάνονται τυχαία υγιείς νεαρές ενήλικες όρνιθες οι οποίες δεν πάσχουν από ιογενείς νόσους, δεν βρίσκονται υπό φαρμακευτική αγωγή και δεν παρουσιάζουν ανωμαλίες στο βάδισμα και χωρίζονται σε ομάδες αγωγής και ομάδες μάρτυρες. Εγκλιματίζονται στις συνθήκες του εργαστηρίου επί 5 τουλάχιστον ημέρες πριν από την έναρξη της μελέτης.

Χρησιμοποιούνται ευρύχωρα κλουβιά, ή περιφράγματα ώστε οι όρνιθες να μπορούν να κινούνται ελεύθερα και να είναι εύκολη η παρατήρηση του βηματισμού.

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται από το στόμα σε ημερήσιες δόσεις, 7 ημέρες την εβδομάδα, κατά προτίμηση με αναγκαστική θρέψη ή με ζελατινούχες κάψουλες. Οι υγρές ουσίες μπορούν

να χορηγούνται χωρίς προηγούμενη αραίωση ή διαλελυμένες σε κατάλληλο φορέα όπως το αραβοσιτέλαιο. Οι στερεές ουσίες πρέπει να διαλύονται, αν είναι δυνατόν, δεδομένου ότι μεγάλες δόσεις στερεών ουσιών σε ζελατινούχες κάψουλες δεν απορροφώνται πάντα ικανοποιητικά. Όταν χρησιμοποιούνται μη υδατικοί φορείς, τα τοξικά χαρακτηριστικά τους πρέπει να είναι γνωστά, και, σε αντίθετη περίπτωση, να προσδιορίζονται πριν από τη δοκιμή.

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Πειραματόζωα

Συνιστάται να χρησιμοποιούνται νεαρές ενήλικες κατοικίδιες ωοτόκες όρνιθες (*Gallus gallus domesticus*), 8 έως 12 μηνών, τυποποιημένου μεγέθους, ποικιλίας και φυλής. Οι όρνιθες πρέπει να έχουν εκτραφεί υπό συνθήκες που τις επιτρέπουν να κινούνται ελεύθερα.

1.4.2.2. Αριθμός και φύλο

Γενικά πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον τρεις ομάδες αγωγής και μια ομάδα μάρτυρας στην οποία χορηγείται μόνο φορέας. Η ομάδα μάρτυρας που λαμβάνει μόνο φορέα πρέπει να υποβάλλεται στην ίδια ακριβώς διαδικασία με την ομάδα αγωγής παραλείποντας όμως τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας.

Ο αριθμός των ζώων που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε ομάδα πρέπει να επαρκεί ώστε να είναι δυνατή η θανάτωση έξι τουλάχιστον ζώων για τη βιοχημική εξέταση (τρία σε καθένα από τα δύο χρονικά σημεία) και η επιβίωση έξι ζώων κατά την περίοδο των 14 ημερών για την παρατήρηση παθολογικών καταστάσεων.

1.4.2.3. Επίπεδα δόσεων

Τα επίπεδα δόσεων πρέπει να επιλέγονται λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα δοκιμής για εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικής επίδρασης μετά από οξεία έκθεση καθώς και τυχόν άλλα διαθέσιμα δεδομένα για την τοξικότητα και την κινητική της ελεγχόμενης ένωσης. Το υψηλότερο επίπεδο δόσης πρέπει να επιλέγεται με στόχο την πρόκληση τοξικών επιδράσεων και κατά προτίμηση εκ των υστέρων εμφανιζόμενων νευροτοξικών επιδράσεων αλλά όχι θανάτου ή έκδηλης δυσφορίας. Στην συνέχεια, επιλέγεται φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσεων με σκοπό να καταδειχθεί τυχόν συνδεόμενη με τη δόση απόκριση και το χαμηλότερο επίπεδο δόσης για το οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις.

1.4.2.4. Οριακή δοκιμή

Εάν μια δοκιμή που έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις περιγραφόμενες για την παρούσα μελέτη διαδικασίες, με επίπεδο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα, δεν οδηγήσει στην παρατήρηση τοξικών εκδηλώσεων και εάν, βάσει των στοιχείων που διατίθενται για ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται εμφάνιση τοξικότητας, είναι δυνατόν να μην απαιτείται μελέτη με υψηλότερη δόση. Η οριακή δοκιμή εφαρμόζεται εφ' όσον από την έκθεση του ανθρώπου δεν προκύψει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης.

1.4.2.5. Περίοδος παρατήρησης

Όλα τα ζώα υποβάλλονται σε καθημερινή τουλάχιστον παρατήρηση κατά την περίοδο της έκθεσής τους και στη συνέχεια, 14 ημέρες ακόμη, εκτός εάν έχει προγραμματιστεί νεκροψία.

1.4.3. Διαδικασία

Η ελεγχόμενη ουσία χορηγείται σε ημερήσιες δόσεις, επτά ημέρες την εβδομάδα επί 28 ημέρες.

1.4.3.1. Γενική παρατήρηση

Η παρατήρηση αρχίζει αμέσως μετά την έναρξη της αγωγής. Όλες οι όρνιθες παρατηρούνται προσεκτικά τουλάχιστον μια φορά την ημέρα κατά τη διάρκεια των 28 ημερών της αγωγής και επί 14 ημέρες στη συνέχεια ή μέχρι την προγραμματισμένη θανάτωσή τους. Καταγράφονται όλες οι εκδηλώσεις τοξικότητας καθώς και ο χρόνος έναρξης, ο τύπος, η σοβαρότητα και η διάρκειά τους. Οι παρατηρήσεις περιλαμβάνουν τις ανωμαλίες στη συμπεριφορά αλλά δεν περιορίζονται σ' αυτές. Η αταξία μετράται βάσει τακτικής βαθμολογικής κλίμακας αποτελούμενης από τέσσερις τουλάχιστον διαβαθμίσεις. Σημειώνεται η εμφάνιση παράλυσης. Τουλάχιστον δύο φορές την εβδομάδα οι όρνιθες απομακρύνονται από τα κλουβιά τους και ακολουθεί περίοδος αναγκαστικής κινητικότητας, όπως το ανέβασμα σκάλας, με σκοπό τη διευκόλυνση της παρατήρησης ανεπαίσθητων τοξικών επιδράσεων. Τα ετοιμοθάνατα ζώα καθώς

και εκείνα που παρουσιάζουν έντονη δυσφορία ή πόνο πρέπει να απομακρύνονται, μόλις αυτό γίνει αντιληπτό, να θανατώνονται με ανώδυνο τρόπο και να νεκροτομούνται.

1.4.3.2. Βάρος σώματος

Όλες οι όρνιας πρέπει να ζυγίζονται αμέσως πριν από τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας και, στη συνέχεια, τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα.

1.4.3.3. Βιοχημικές εξετάσεις

Επιλέγονται τυχαία έξι όρνιας από καθεμία από τις ομάδες αγωγής και μάρτυρα που λαμβάνει μόνο φορέα και θανατώνονται λίγες μέρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης. Ο εγκέφαλος και ο οσφυϊκός νωτιαίος μυελός προετοιμάζονται και εξετάζονται για την αναστολή της δράσης της εστεράσης του νευρικού ιστού που προσβάλλεται κατά τη νευροπάθεια. Η εξέταση της αναστολής της εστεράσης αυτής σε ισχιακό νευρικό ιστό μπορεί να είναι επίσης χρήσιμη. Κανονικά, τρία ζώα από την ομάδα μάρτυρα και από καθεμία από τις ομάδες αγωγής θανατώνονται μετά την πάροδο 24 ωρών και τρία ακόμη μετά την πάροδο 48 ωρών από τη χορήγηση της τελευταίας δόσης. Εάν από μελέτες οξείας έκθεσης ή από άλλες μελέτες (τοξικοκινητικής, επί παραδείγματι) προκύπτει ότι είναι προτιμότερο η θανάτωση να πραγματοποιηθεί σε άλλη χρονική στιγμή μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης, τότε οι προαναφερόμενοι χρόνοι μεταβάλλονται ανάλογα και η νέα επιλογή αιτιολογείται. Εάν θεωρείται σκόπιμο, στα δείγματα αυτά μπορεί να προσδιοριστεί και η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Ωστόσο, μπορεί να συμβεί αυτόματη επαναδραστηριοποίηση της AChE in vivo, και να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της δυνατότητας της ουσίας να δρα ως αναστολέας της AChE.

1.4.3.4. Νεκροψία

Η γενική νεκροψία όλων των ζώων (προγραμματισμένη θανάτωση και θανάτωση ετοιμοθανάτων ζώων) πρέπει να περιλαμβάνει παρατήρηση της όψης του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού.

1.4.3.5. Ιστοπαθολογική εξέταση

Από τα ζώα που επέζησαν μετά την περίοδο παρατήρησης και δεν χρησιμοποιήθηκαν για βιοχημικές μελέτες λαμβάνονται νευρικοί ιστοί και υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση. Οι ιστοί στερεώνονται in situ με τεχνικές έγχυσης. Λαμβάνονται τομές από την παρεγκεφαλίδα (στο μέσο του διαμήκου άξονα) από τον προμήκη μυελό, τον νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα. Οι τομές νωτιαίου μυελού πρέπει να προέρχονται από την άνω αυχενική μοίρα, τη μεσοθωρακική και την οσφυοϊερή χώρα. Επίσης πρέπει να λαμβάνονται τομές από την περιφερική περιοχή του κνημιαίου νεύρου και των διακλαδώσεων του στο γαστροκνήμιο μυ καθώς και από το ισχιακό νεύρο. Οι τομές χρώνονται με κατάλληλες ειδικές για τη μυελίνη και τους νευράξονες χρωστικές. Αρχικά υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση οι διατηρημένοι ιστοί όλων των ζώων της ομάδας μάρτυρα και της ομάδας που έχει λάβει την υψηλότερη δόση. Εφ' όσον προκύψουν ενδείξεις νευροτοξικότητας στην ομάδα της υψηλότερης δόσης, υποβάλλονται σε μικροσκοπική εξέταση και οι όρνιας των ομάδων στις οποίες χορηγήθηκε ενδιάμεση και χαμηλή δόση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Κατά κανόνα, αν τα ληφθέντα αποτελέσματα στα τελικά σημεία ελέγχου που επελέγησαν για την παρούσα μέθοδο (βιοχημικές εξετάσεις, ιστοπαθολογική εξέταση, παρατήρηση της συμπεριφοράς) είναι αρνητικά, δεν απαιτείται συνέχιση των δοκιμών για την εκ των υστέρων εμφάνιση νευροτοξικότητας. Σε περίπτωση όμως που τα αποτελέσματα είναι ασαφή ή αβέβαια μπορεί να απαιτηθεί περαιτέρω αξιολόγηση.

Πρέπει να παρέχονται δεδομένα για κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα πρέπει να συνοψίζονται σε πίνακα ο οποίος περιλαμβάνει, για κάθε ομάδα δοκιμής, τον αριθμό των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις, αλλαγές στη συμπεριφορά ή βιοχημικές μεταβολές, τον τύπο και τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή μεταβολών, το ποσοστό των ζώων που εμφάνισαν τις κάθε τύπου και σοβαρότητας αλλοιώσεις ή μεταβολές.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης πρέπει να αξιολογούνται βάσει της συχνότητας εμφανίσεώς τους, της σοβαρότητας, και της συσχέτισης των επιδράσεων στη συμπεριφορά, των βιοχημικών και ιστοπαθολογικών επιδράσεων καθώς και όλων των άλλων επιδράσεων που παρατηρήθηκαν στις ομάδες αγωγής και τις ομάδες μάρτυρες.

Τα αριθμητικά αποτελέσματα αξιολογούνται με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους γενικής αποδοχής οι οποίες επιλέγονται κατά το σχεδιασμό της μελέτης.

3. ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει, εάν είναι δυνατόν, τις ακόλουθες πληροφορίες:

Για τα πειραματόζωα

- φυλή,
- αριθμός και ηλικία,
- προέλευση, συνθήκες στέγασης κ.λπ.,
- βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Για τις συνθήκες δοκιμής:

- λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα, τη σταθερότητα και την ομοιογένεια της ελεγχόμενης ουσίας, κατά περίπτωση,
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας,
- λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού,
- αιτιολόγηση της επιλογής της δόσης,
- λεπτομερής περιγραφή των δόσεων που χορηγήθηκαν, με στοιχεία για το φορέα, τον όγκο και τη φυσική κατάσταση του χορηγηθέντος προϊόντος,
- αιτιολόγηση της επιλογής άλλων χρόνων, εάν ο βιοχημικός προσδιορισμός δεν έχει διεξαχθεί στις 24 και 48 ώρες.

Για τα αποτελέσματα:

- δεδομένα για το βάρος σώματος,
- δεδομένα για την τοξική αντίδραση ανά επίπεδο δόσης, συμπεριλαμβανομένης της θνησιμότητας,
- επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις,
- φύση, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη),
- αναλυτική περιγραφή των βιοχημικών μεθόδων και των ευρημάτων,
- ευρήματα νεκροψίας,
- αναλυτική περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων,
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου απαιτείται.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η παρούσα μέθοδος είναι παραπλήσια της TG 419 του ΟΟΣΑ

B.39. ΔΟΚΙΜΗ ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ DNA (UDS) ΜΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ *IN VIVO*

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντίγραφο της OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της δοκιμής μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* είναι η αναγνώριση ουσιών που επάγουν επιδιόρθωση του DNA στα ηπατικά κύτταρα υποβληθέντων σε αγωγή ζώων (βλ. 1,2,3,4).

Αυτή η *in vivo* δοκιμή παρέχει μέθοδο για τη διερεύνηση των γονοτοξικών επιδράσεων χημικών ουσιών στο ήπαρ. Το μετρούμενο τελικό σημείο είναι ενδεικτικό της βλάβης του DNA και της επακόλουθης επιδιόρθωσης στα ηπατικά κύτταρα. Το ήπαρ είναι συνήθως ο κυριότερος τόπος μεταβολισμού των απορροφούμενων ενώσεων. Αποτελεί συνεπώς πρόσφορο τόπο για τη μέτρηση της βλάβης του DNA *in vivo*.

Εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν θα φθάσει στον ιστό-στόχο, δεν είναι σωστό να χρησιμοποιείται η δοκιμή αυτή.

Το τελικό σημείο της μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) μετρείται προσδιορίζοντας την πρόσληψη επισημασμένων νουκλεοσιδίων σε κύτταρα που δεν υπόκεινται σε προγραμματισμένη (S-φάση) σύνθεση DNA. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι ο προσδιορισμός της πρόσληψης επισημασμένης με τρίτιο θυμιδίνης (³H-TdR) με αυτοακτινογράφιση. Για τις *in vivo* δοκιμές UDS χρησιμοποιείται κατά προτίμηση ήπαρ από επίμυες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι ιστοί αντί για ήπαρ, αυτό όμως δεν αποτελεί θέμα της παρούσας μεθόδου.

Η ανίχνευση αποκρίσεως UDS εξαρτάται από τον αριθμό των βάσεων DNA που αποκόπηκαν και αντικαταστάθηκαν στο σημείο της βλάβης. Συνεπώς, η δοκιμή UDS έχει ιδιαίτερη αξία για την ανίχνευση εκτεταμένων επιδιορθώσεων (20-30 βάσεις) που προκαλούνται από ουσίες. Αντιθέτως, οι περιορισμένες επιδιορθώσεις (1-3 βάσεις) ανιχνεύονται με πολύ μικρότερη ευαισθησία. Περαιτέρω, μεταλλαξογόνα συμβάντα μπορεί να προκύψουν λόγω μη επιδιόρθωσης, κακής επιδιόρθωσης ή κακής αντιγραφής αλλοιώσεων DNA. Η έκταση της απόκρισης UDS δεν αποτελεί ένδειξη για την πιστότητα της διεργασίας επιδιόρθωσης. Επιπλέον, μπορεί ένα μεταλλαξογόνο να αντιδρά με το DNA αλλά η βλάβη του DNA να μην επιδιορθώνεται με τη διεργασία της επιδιόρθωσης αποκοπής. Η έλλειψη εξειδικευμένων πληροφοριών για τη μεταλλαξογόνο δραστηριότητα από τη δοκιμή UDS αντισταθμίζεται από την εν δυνάμει ευαισθησία αυτού του τελικού σημείου επειδή μετρείται σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Βλ. επίσης Γενική Εισαγωγή Μέρος Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Κύτταρα σε επιδιόρθωση: καθαρός πυρηνικό κόκκος (NNG) μεγαλύτερος από μία προκαθορισμένη τιμή που πρέπει να αιτιολογείται από το εργαστήριο που διεξάγει τη δοκιμή.

Καθαροί πυρηνικοί κόκκοι (NNG): ποσοτικό μέτρο της UDS δραστηριότητας κυττάρων σε αυτοακτινογραφικές δοκιμές UDS που υπολογίζεται αφαιρώντας το μέσο αριθμό κυτταροπλασματικών κόκκων σε πυρηνοϊσοδύναμες κυτταροπλασματικές περιοχές (CG) από τον αριθμό των πυρηνικών κόκκων (NG): $NNG = NG - CG$. Ο αριθμός των NNG υπολογίζεται για τα μεμονωμένα κύτταρα και κατόπιν αθροίζονται για τα κύτταρα μιας καλλιέργειας, παράλληλων καλλιεργειών, κλπ.

Μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA (UDS): Επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη προκληθείσα από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες.

1.3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμή UDS με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* δείχνει επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες. Η δοκιμή στηρίζεται συνήθως στην προσθήκη $^3\text{H-TdR}$ στο DNA ηπατικών κυττάρων που εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα κυττάρων στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσληψη $^3\text{H-TdR}$ προσδιορίζεται συνήθως με αυτοακτινογράφιση επειδή η τεχνική αυτή δεν είναι τόσο επιδεκτική σε παρεμβολές από κύτταρα S-φάσης όπως, π.χ., η υγρή σπινθηρογραφία.

1.4 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1 Προετοιμασίες

1.4.1.1 Επιλογή ζωικών ειδών

Συνήθως χρησιμοποιούνται επίμυες, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κατάλληλα είδη θηλαστικών. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους για κάθε φύλο.

1.4.1.2 Συνθήκες στέγασης και διατροφής

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στη Γενική Εισαγωγή του Μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60%.

1.4.1.3 Προετοιμασία των ζώων

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν πιθανές επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Τα ζώα λαμβάνουν μία και μοναδική ταυτότητα και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής για να μπορέσουν να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.1.4 Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία

Στερεές υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να τίθενται υπό μορφή εναιωρήματος σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς και να αραιώνονται, εφόσον χρειάζεται, πριν να χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές υπό δοκιμή ουσίες μπορούν να χορηγούνται απευθείας ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της υπό δοκιμή ουσίας εκτός κι αν τα στοιχεία σχετικά με τη σταθερότητα της ουσίας επιτρέπουν τη χρήση έτοιμων παρασκευασμάτων.

1.4.2 Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1 Διαλύτης/φορέας

Ο διαλύτης/φορέας δεν θα πρέπει να εμφανίζει τοξική δράση στα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσεων αλλά ούτε και να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την υπό δοκιμή ουσία. Εφόσον ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν ανήκει στους γνωστούς, η χρήση του θα πρέπει να στηρίζεται στην ύπαρξη στοιχείων που αποδεικνύουν τη συμβατότητά του. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση ενός υδατικού διαλύτη/φορέα.

1.4.2.2 Μάρτυρες

Σε κάθε ανεξαρτήτως εκτελούμενο μέρος της δοκιμής, θα πρέπει να περιλαμβάνονται ταυτόχρονα θετικοί και αρνητικοί (διαλύτης ή φορέας) μάρτυρες. Με εξαίρεση την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία, τα ζώα στις ομάδες μαρτυρίας θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με εκείνο των ζώων στις υποβαλλόμενες σε αγωγή ομάδες.

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να είναι ουσίες που είναι γνωστό ότι εμφανίζουν το φαινόμενο της UDS όταν χορηγούνται σε δόσεις εκθέσεως που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Θετικοί μάρτυρες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε δόσεις που παρέχουν μέτρια απόκριση (4) Οι δόσεις μπορούν να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες είναι

Χρόνος δειγματοληψίας	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Πρώτες δειγματοληψίες (2-4 ώρες)	N-Νιτροζοδιμεθυλαμίνη	62-75-9	200-249-8
Δεύτερες δειγματοληψίες (12-16 ώρες)	N-2-Φλουορενυλοακεταμίδιο (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες κατάλληλες ουσίες. Επίσης, οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας.

1.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1 Αριθμός και φύλλο των ζώων

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος αριθμός ζώων ώστε να λαμβάνεται υπόψη η φυσική βιολογική ποικιλία στην απόκριση. Κάθε ομάδα θα πρέπει να αποτελείται από 3 τουλάχιστον για εξέταση ζώα. Εφόσον υπάρχουν σημαντικά πρότερα στοιχεία, για τις ομάδες μάρτυρες, θετικούς και αρνητικούς, απαιτούνται μόνον 1 ή 2 ζώα.

Εάν κατά το χρόνο της έρευνας υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες στο ίδιο είδος και με την ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ των φύλων, τότε αρκεί η δοκιμή να γίνει σε ζώα ενός φύλου, κατά προτίμηση αρσενικά. Εφόσον η έκθεση σε μια χημική ουσία αφορά μόνο το ένα φύλο, όπως π.χ. στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών, η δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιείται με ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2 Χρονοδιάγραμμα αγωγής

Οι εξεταζόμενες ουσίες χορηγούνται εν γένει με μία μόνη αγωγή.

1.5.3 Επίπεδα δόσεων

Κανονικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο επίπεδα δόσεων. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημάδια τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσεων, με βάση το ίδιο δοσολογικό καθεστώς, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Γενικά, η χαμηλότερη δόση αντιστοιχεί στο 50% έως 25% της υψηλής δόσης.

Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Εάν πραγματοποιηθεί μελέτη διαπίστωσης του εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, η μελέτη αυτή θα πρέπει να πραγματοποιείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο και αγωγή που χρησιμοποιούνται και στην κύρια μελέτη.

Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στο ήπαρ (π.χ. πυκνωτικούς πυρήνες).

1.5.4 Δοκιμή οριακής δόσης

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να μην είναι αναγκαία η πραγματοποίηση πλήρους μελέτης. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να δώσει μία ένδειξη για το αν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5 Χορήγηση δόσεων

Η υπό δοκιμή ουσία χορηγείται συνήθως με διασωλήνωση χρησιμοποιώντας στομαχικό σωλήνα ή κατάλληλο σωλήνα διασωλήνωσης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί έκθεσης εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Δεν συνιστάται πάντως η ενδοπεριτοναϊκή οδός επειδή με τον τρόπο αυτό το ήπαρ μπορεί να εκτεθεί απευθείας στην υπό δοκιμή ουσία αντί μέσω του κυκλοφοριακού συστήματος. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με διασωλήνωση ή έγχυση εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2 ml/100g βάρους σώματος. Αν χρησιμοποιηθούν μεγαλύτεροι όγκοι, αυτό πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές ουσίες οι οποίες κανονικά εμφανίζουν εντονότερα αποτελέσματα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, οι διαφοροποιήσεις στον όγκο θα πρέπει να ελαχιστοποιούνται προσαρμόζοντας τη συγκέντρωση ώστε να διασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

1.5.6 Προετοιμασία των ηπατικών κυττάρων

Τα ηπατικά κύτταρα λαμβάνονται από υποβληθέντα σε αγωγή ζώα κανονικά 12-16 ώρες μετά τη χορήγηση. Χρειάζεται εν γένει μία πρόσθετη πρόωμη δειγματοληψία (κανονικά 2-4 ώρες μετά την αγωγή) εκτός κι αν υπάρχει σαφής θετική απόκριση στις 12-16 ώρες. Εντούτοις, μπορούν να γίνουν δειγματοληψίες σε εναλλακτικά χρονικά διαστήματα εφόσον τούτο αιτιολογείται με βάση τοξικοκινητικά δεδομένα.

Βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων θηλαστικών παρασκευάζονται συνήθως εγχύοντας επιτοπίως στο ήπαρ κολλαγενάση και αφήνοντας τα προσφάτως διασταθμένα ηπατικά κύτταρα να προσκολληθούν σε κατάλληλη επιφάνεια. Τα ηπατικά κύτταρα από αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να εμφανίζουν βιωσιμότητα (5) τουλάχιστον 50%.

1.5.7 Προσδιορισμός της UDS

Προσφάτως απομονωθέντα ηπατικά κύτταρα θηλαστικών επωάζονται συνήθως σε μέσο που περιέχει ³H-TdR για κατάλληλο χρονικό διάστημα, π.χ. 3-8 ώρες. Στο τέλος της περιόδου επώασης, το μέσο πρέπει να απομακρύνεται από τα κύτταρα τα οποία μπορούν κατόπιν να επωαστούν σε μέσο που περιέχει περίσσεια μη επισημασμένης θυμιδίνης για να μειωθεί η μη ενσωματωμένη ραδιενέργεια ("cold chase"). Τα κύτταρα κατόπιν εκπλένονται, στερεώνονται και ξηραίνονται. Για μεγαλύτερους χρόνους επώασης, μπορεί να μη χρειάζεται η φάση της "cold chase". Οι αντικειμεφόροι πλάκες βυθίζονται σε αυτοακτινογραφικό γαλάκτωμα, εκτίθενται στο σκότος (π.χ. ψύχονται για 7-14 ημέρες), αναπτύσσονται, χρωματίζονται και μετρούνται οι εκτεθειμένοι κόκκοι αργύρου. Για κάθε ζώο ετοιμάζονται δύο έως τρεις αντικειμενοφόροι πλάκες.

1.5.8 Ανάλυση

Τα αντικειμενοφόρα παρασκευάσματα θα πρέπει να περιέχουν ικανό αριθμό κυττάρων κανονικής μορφολογίας για να μπορεί να γίνει σημαντική εκτίμηση της UDS. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται με μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν σημάδια έκδηλης τοξικότητας. (π.χ. πυκνώση, μειωμένα επίπεδα ραδιοεπισήμανσης).

Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να λαμβάνουν ένα κωδικό πριν από την καταμέτρηση των κόκκων. Κανονικά μετρούνται 100 κύτταρα από κάθε ζώο από δύο τουλάχιστον αντικειμενοφόρους πλάκες. Τυχόν καταμέτρηση λιγότερων των 100 κυττάρων/ζώο θα πρέπει να αιτιολογείται. Για τους πυρήνες S-φάσεως δεν μετριέται ο αριθμός κόκκων, μπορεί όμως να καταγραφεί η αναλογία των κυττάρων S-φάσεως.

Η ποσότητα της ενσωματωμένης $^3\text{H-TdR}$ στους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα μορφολογικός κανονικών κυττάρων, όπως δεικνύεται από την εναπόθεση κόκκων αργύρου, θα πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλες μεθόδους.

Προσδιορίζεται ο αριθμός κόκκων στους πυρήνες (πυρηνικοί κόκκοι, NG) και στις πυρηνοϊσοδύναμες περιοχές στο κυτταρόπλασμα (κυτταροπλασματικοί κόκκοι, CG). Οι CG μετριούνται είτε από την ισχυρότερα επισημασμένη περιοχή του κυτταροπλάσματος, είτε από το μέσο όρο δύο ή τριών τυχαίων αριθμών κυτταροπλασματικών κόκκων κοντά στον πυρήνα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι καταμέτρησης (π.χ. καταμέτρηση σε ολόκληρο το κύτταρο) εφόσον υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση (6).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να δίνονται επιμέρους αποτελέσματα για κάθε αντικειμενοφόρο και ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα. Ο αριθμός των καθάρων πυρηνικών κόκκων (NNG) θα πρέπει να υπολογίζεται για κάθε κύτταρο, για κάθε ζώο και για κάθε δόση και χρονική στιγμή αφαιρώντας τον αριθμό των CG από τον αριθμό των NG. Εφόσον μετρηθούν τα "κύτταρα σε επιδιόρθωση", θα πρέπει τα κριτήρια για τον ορισμό των "κυττάρων σε επιδιόρθωση" να αιτιολογούνται και να στηρίζονται σε προϋπάρχοντα ή παράλληλα στοιχεία αρνητικών μαρτύρων. Αριθμητικά αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν με στατιστικές μεθόδους. Εφόσον χρησιμοποιούνται, οι στατιστικές δοκιμές θα πρέπει να επιλέγονται και να αιτιολογούνται πριν από τη διεξαγωγή της έρευνας..

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παραδείγματα κριτηρίων για αποκρίσεις θετικών/αρνητικών μαρτύρων είναι τα ακόλουθα:

θετικοί δεδομένα,	(i)	τιμές NNG μεγαλύτερες ενός προκαθορισμένου κατώτερου ορίου που αιτιολογείται με βάση εργαστηριακά προϋπάρχοντα
ή	(ii)	τιμές NNG σημαντικά μεγαλύτερες από του παράλληλου μάρτυρα,
αρνητικοί	(i)	τιμές NNG μέσα ή κάτω από τα προϋπάρχοντα δεδομένα για το κατώτερο όριο,
ή	(ii)	τιμές NNG μη σημαντικά μεγαλύτερες από τον παράλληλο μάρτυρα.

Θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των δεδομένων, δηλ. θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι όπως η μεταξύ των ζώων διακύμανση, η σχέση δόσης-απόκρισης και η κυτταροτοξικότητα. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι. Πάντως, σε μία θετική απόκριση, δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα

Αν και τα περισσότερα πειράματα θα δίνουν σαφώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα, σε σπάνιες περιπτώσεις τα δεδομένα ενδέχεται να μην επιτρέπουν τη εξαγωγή οριστικού συμπεράσματος σχετικά με τη δραστηριότητα της υπό δοκιμή ουσίας. Τα αποτελέσματα μπορεί να παραμένουν διφορούμενα ή αμφισβητήσιμα άσχετα με το πόσες φορές θα επαναληφθεί το πείραμα.

Θετικά αποτελέσματα από τη δοκιμή UDS με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία προκαλεί βλάβη στο DNA σε ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* που μπορεί να επιδιορθωθεί με μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA *in vitro*. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν προκαλεί βλάβη στο DNA που να μπορεί να ανιχνευθεί με τη δοκιμή αυτή.

Θα πρέπει να εξετάζεται η πιθανότητα της υπό δοκιμή ουσίας να φθάσει στη γενική κυκλοφορία ή ειδικά στον ιστό στόχο (π.χ. συστηματική τοξικότητα).

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/Φορέας

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,
- διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέας, εφόσον είναι γνωστές,

Εξετασθέντα ζώα:

- χρησιμοποιηθέν είδος/φυλή,
- αριθμό, ηλικία και φύλο των ζώων,
- πηγή, συνθήκες στέγασης, διαίτα, κλπ,
- βάρος των μεμονωμένων ζώων στην έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένου του εύρους των βαρών σώματος, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα

Συνθήκες δοκιμής:

- θετικούς και αρνητικούς (φορέα/διαλύτη) μάρτυρες,
- στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,
- αιτιολογία επιλογής του επιπέδου δόσεως,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολογία της επιλεγείσας οδού χορήγησης,
- μεθόδους επαλήθευσης ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή τον ιστό-στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη διαίτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού
- λεπτομερή περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,

- μεθόδους για τις μετρήσεις της τοξικότητας,
- μεθόδους προετοιμασίας και καλλιέργειας των ηπατικών κυττάρων,
- χρησιμοποιηθείσα αυτοακτινογραφική τεχνική,
- αριθμό αντικειμενοφόρων πλακών και αριθμούς καταμετρηθέντων κυττάρων,
- κριτήρια αξιολόγησης,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

- μέσες τιμές κατά αντικειμενοφόρο, ζώο και ομάδα για τους πυρηνικούς κόκκους, κυτταροπλασματικούς κόκκους και καθαρούς πυρηνικούς κόκκους,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό
- στατιστικές εκτιμήσεις, εφόσον υπάρχουν,
- σημάδια τοξικότητας,
- παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,
- προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις.
- αριθμό “κυττάρων σε επιδιόρθωση”, εφόσον προσδιορίστηκε,
- αριθμό κυττάρων “S-φάσεως”, εφόσον προσδιορίστηκε,
- βιωσιμότητα των κυττάρων.

Εξέταση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B. and 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. and 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. and Fox M., (Eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.
4. Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, 263-285.
5. Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). *Mutation Res.*, 291, 21-27.
6. Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and 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. ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (EKEEM, Κοινό Κέντρο Ερευνών, Ευρωπαϊκή Επιτροπή) έχει εγκρίνει ως επιστημονικά έγκυρες δύο *in vitro* δοκιμές δερματικής διαβρωτικότητας, τη δοκιμασία διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER - transcutaneous electrical resistance) δέρματος επίμυος και δοκιμή που χρησιμοποιεί ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος (1)(2)(3). Η μελέτη επικύρωσης του EKEEM κατέδειξε ότι και οι δύο δοκιμές είναι σε θέση να διακρίνουν με αξιόπιστο τρόπο γνωστές διαβρωτικές από μη διαβρωτικές ουσίες του δέρματος. Πέραν τούτου, το πρωτόκολλο της δοκιμής με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος, επέτρεψε ορθή διάκριση μεταξύ των διαφόρων βαθμών διαβρωτικών επιδράσεων (γνωστά ισχυρά διαβρωτικά του δέρματος, R35, και άλλα διαβρωτικά του δέρματος R34) (2). Η περιγραφή των δύο μεθόδων και η διαδικασία της δοκιμής παρέχονται κατωτέρω. Η επιλογή της μεθόδου γίνεται με βάση τις ειδικές απαιτήσεις και τις προτιμήσεις του χρήστη.

Βλ. επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Διάβρωση του δέρματος: είναι η πρόκληση μη αντιστρεπτής βλάβης στο δερματικό ιστό μετά την εφαρμογή ελεγχόμενης ουσίας.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Ουδεμία, αλλά βλ. σημεία 1.5.3.4 και 1.7.2.3.

1.4 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗΣ ΗΛΕΚΤΡΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ (TER) ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΕΠΙΜΥΟΣ

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται επί 24 ώρες κατ' ανώτατο όριο στις επιδερμικές επιφάνειες δίσκων δέρματος που έχουν ληφθεί από τις δορές νεαρών επιμύων οι οποίοι έχουν θανατωθεί με μη βάνανσο τρόπο. Τα διαβρωτικά υλικά προσδιορίζονται βάσει της ικανότητάς τους να προκαλούν απώλεια της ακεραιότητας της κερατίνης στιβάδας και της φρακτικής λειτουργίας, η οποία μετράται ως μείωση της εγγενούς διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε επίπεδα χαμηλότερα ενός κατώτατου ορίου (5kΩ) (4)(5). Ερεθιστικά και μη ερεθιστικά υλικά δεν προκαλούν μείωση της TER σε επίπεδα χαμηλότερα του κατώτατου ορίου. Στη διαδικασία της δοκιμής μπορεί να ενσωματωθεί ένα στάδιο δέσμωσης χρωστικής για τις τασιενεργές ουσίες και τις ουδέτερες οργανικές ενώσεις (για τους ορισμούς βλ. υποσημείωση (6)) ώστε να μειωθεί ο αριθμός των ψευδοθετικών αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με χημικές ουσίες αυτού του τύπου συγκεκριμένα (2) (7).

1.5 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ TER ΔΕΡΜΑΤΟΣ ΕΠΙΜΥΟΣ

1.5.1 Πειραματόζωα

Για την προετοιμασία των δίσκων δέρματος απαιτούνται νεαροί (20-23 ημερών) επίμυες (στέλεχος Wistar ή παρόμοιο). Αφαιρείται επιμελώς το τρίχωμα από την περιοχή της ράχης και των πλευρών με μικρή ξυριστική μηχανή για ζώα. Τα πειραματόζωα εκπλύνονται και σφουγγίζονται επιμελώς ενώ η περιοχή εμβαπτίζεται σε αντιβιοτικό διάλυμα (που περιέχει, επί παραδείγματι, στρεπτομυκίνη, πενικιλίνη, χλωραμφαινικόλη ή αμοφτερικίνη, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης). Τα πειραματόζωα εκπλύνονται εκ νέου με αντιβιοτικά την τρίτη ή τέταρτη ημέρα με την πρώτη έκπλυση και χρησιμοποιούνται εντός τριών ημερών (η ηλικία των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 31 ημέρες για την προετοιμασία της δοράς).

1.5.2 Προετοιμασία των δίσκων δέρματος

Τα πειραματόζωα θανατώνονται με μη βάνανσο τρόπο. Αφαιρείται το δέρμα από τη ράχη κάθε ζώου και απαλλάσσεται από την περίσσεια λίπους με προσεκτική απομάκρυνσή του από το δέρμα. Η δορά τοποθετείται πάνω από το άκρο σωλήνα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE) με τρόπο ώστε η επιφάνεια της επιδερμίδας να βρίσκεται σε επαφή με το σωλήνα. Το δέρμα συγκρατείται στη θέση του με τη βοήθεια ελαστικού δακτυλίου Ο ο οποίος στερεώνεται με πίεση στο άκρο του σωλήνα, ενώ η περίσσεια ιστών αποκόπτεται. Οι διαστάσεις του σωλήνα και του δακτυλίου παρέχονται στο σχήμα 1. Στη συνέχεια, η ένωση του ελαστικού δακτυλίου Ο με το άκρο του σωλήνα PTFE στεγανοποιείται με τη βοήθεια βαζελίνης. Ο σωλήνας στηρίζεται με ελατηριωτό σφιγκτήρα ενός υποδοχέα που περιέχει διάλυμα θειικού μαγνησίου (154mM) (σχήμα 2).

1.5.3 Διαδικασία δοκιμής

1.5.3.1 Εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού

Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες (150μl) εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια που βρίσκεται στο εσωτερικό του σωλήνα (σχήμα 2). Όταν εξετάζονται στερεά υλικά, εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα στερεού υλικού στο δίσκο ώστε να καλύπτεται το σύνολο της επιφάνειας της επιδερμίδας. Στη συνέχεια, 150μl απιονισμένου νερού προστίθενται στο στερεό υλικό και οι σωλήνες αναδεύονται ήπια. Οι ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να είναι σε μέγιστη δυνατή επαφή με το δέρμα. Για ορισμένα στερεά αυτό μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση στους 30°C κατ' ανώτατο όριο και τήξη της ελεγχόμενης ουσίας ή με άλεσμα ώστε να ληφθεί κοκκοποιημένο υλικό ή σκόνη.

Για κάθε ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιούνται τρεις δίσκοι δέρματος. Οι ελεγχόμενες ουσίες διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 24 ώρες (βλ. επίσης 1.5.3.4). Στη συνέχεια εκπλύνονται με εκτόξευση τρεχούμενου νερού θερμοκρασίας έως 30°C έως ότου απομακρυνθούν πλήρως. Η απομάκρυνση ελεγχόμενων ουσιών που έχουν στερεοποιηθεί στο εσωτερικό του σωλήνα είναι δυνατόν να διευκολυνθεί με εκτόξευση θερμού νερού θερμοκρασίας 30°C περίπου.

1.5.3.2 Μετρήσεις TER

Η TER μετράται με τη βοήθεια γέφυρας δεδομένων (databridge) που λειτουργεί με εναλλασσόμενο ρεύμα και χαμηλή τάση (π.χ. AIM 401 ή 6401, ή αντίστοιχη). Πριν από τη μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, ελαττώνεται η επιφανειακή τάση του δέρματος με την προσθήκη αιθανόλης 70% στην ποσότητα που απαιτείται για να καλυφθεί η επιδερμίδα. Λίγα λεπτά αργότερα, ο σωλήνας αντιστρέφεται για να απομακρυνθεί η αιθανόλη και ο ιστός ενυδατώνεται με την προσθήκη 3ml διαλύματος θειικού μαγνησίου (154mM). Τα ηλεκτρόδια της γέφυρας δεδομένων τοποθετούνται σε μια από τις δύο πλευρές του δίσκου δέρματος για τη μέτρηση της αντίστασης σε kΩ/δίσκο δέρματος (σχήμα 2). Οι διαστάσεις των ηλεκτροδίων και το μήκος του ηλεκτροδίου που βρίσκεται κάτω από τους σφιγκτήρες τύπου κροδοδείλου παρέχονται στο σχήμα 1. Ο σφιγκτήρας του εσωτερικού (χονδρού) ηλεκτροδίου τοποθετείται στην κορυφή του σωλήνα PTFE κατά τη μέτρηση της αντίστασης ώστε να εξασφαλίζεται η εμπάτιση σταθερού τμήματος του ηλεκτροδίου στο διάλυμα θειικού μαγνησίου. Το εξωτερικό (λεπτό) ηλεκτρόδιο τοποθετείται εντός του υποδοχέα με τρόπο ώστε να ακουμπάει στον πυθμένα του. Η απόσταση μεταξύ βάσης του ελατηριωτού σφιγκτήρα και της βάσης του σωλήνα PTFE διατηρείται σταθερή (σχήμα1) δεδομένου ότι επηρεάζει τη λαμβανόμενη τιμή της αντίστασης.

Σημειώνεται ότι αν η μετρούμενη τιμή της αντίστασης υπερβαίνει τα 20 kΩ, αυτό μπορεί να οφείλεται στην ελεγχόμενη ουσία που επικαλύπτει την επιδερμική επιφάνεια του δίσκου δέρματος. Μπορεί να επιχειρηθεί απομάκρυνση της ουσίας αυτής με ανάδευση του σωλήνα PTFE επί 10 δευτερόλεπτα περίπου αφού καλυφθεί το στόμιό του με το υ προστατευόμενο με γάντι αντίχειρα. Το διάλυμα θειικού μαγνησίου αποχύνεται και επαναλαμβάνεται η μέτρηση της αντίστασης με νέο διάλυμα θειικού μαγνησίου.

Οι μέσες μετρούμενες τιμές TER γίνονται αποδεκτές εφόσον οι σύγχρονές τους θετικές και αρνητικές τιμές που έχουν προκύψει για την ουσία μάρτυρα περικλείονται στις αποδεκτές για τη μέθοδο περιοχές τιμών. Οι υποδεικνυόμενες ουσίες μάρτυρες και οι αντίστοιχες αποδεκτές περιοχές τιμών ηλεκτρικής αντίστασης για την περιγραφόμενη μεθοδολογία και συσκευή έχουν ως εξής:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (kΩ)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ (36%) 10M	0,5 – 1,0
Αρνητικός	Αποσταγμένο νερό	10 – 25

1.5.3.3 Τροποποιημένη διαδικασία για τασιενεργές ουσίες και ουδέτερες οργανικές ενώσεις

Εάν οι τιμές TER ελεγχόμενων ουσιών που εμπίπτουν στην κατηγορία των τασιενεργών ουσιών ή των ουδέτερων οργανικών ενώσεων είναι μικρότερες από ή ίσες με 5 kΩ, μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτίμηση της διεύθυνσης χρωστικής στους ιστούς. Με τη διαδικασία αυτή θα προσδιοριστεί κατά πόσο τα αποτελέσματα είναι ψευδοθετικά (2).

1.5.3.3.1 Εφαρμογή και απομάκρυνση της χρωστικής ουσίας σουλφοροδαμίνης Β

Μετά την αρχική κατεργασία με την ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια κάθε δίσκου δέρματος για δύο ώρες, 150 μl διαλύματος σουλφοροδαμίνης Β σε απεσταγμένο νερό 10% (w/v). Στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος εκπλύνονται με εκτόξευση τρεχούμενου νερού θερμοκρασίας δωματίου επί 10 δευτερόλεπτα περίπου ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια ή αδέσμευτη χρωστική. Έκαστος των δίσκων δέρματος αφαιρείται από τον σωλήνα PTFE και τοποθετείται με φιαλίδιο (π.χ. γυάλινο φιαλίδιο σπινθηρισμού των 20 ml) που περιέχει απιονισμένο νερό (8 ml). Τα φιαλίδια αναδεύονται ήπια επί 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τυχόν επι πλεόν περίσσεια ή αδέσμευτη χρωστική. Επαναλαμβάνεται η έκπλυση με τρεχούμενο νερό και, στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται και τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 ml διαλύματος δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) σε απεσταγμένο νερό 30% (w/v). Τα φιαλίδια αφήνονται προς επώαση στους 60°C επί μια νύχτα. Μετά την επώαση, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται από τα φιαλίδια και απορρίπτονται ενώ το εναπομένον διάλυμα φυγοκεντρείται επί 8 λεπτά στους 21 °C (σχετική φυγοκεντρος δύναμη ~175). Από την υπερκείμενη στιβάδα λαμβάνεται 1 ml και αραιώνεται σε αναλογία 1 προς 5 (v/v) [δηλ. 1 ml + 4 ml] με διάλυμα 30% (w/v) SDS σε απεσταγμένο νερό. Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος μετράται στα 565 nm περίπου.

1.5.3.3.2 Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε χρωστική

Η περιεκτικότητα κάθε δίσκου σε σουλφοροδαμίνη Β υπολογίζεται με βάση τις τιμές οπτικής πυκνότητας (συντελεστής μοριακής απόσβεσης της σουλφοροδαμίνης Β στα 565 nm = 8.7×10^4 μοριακό βάρος = 580). Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα εκάστου δίσκου δέρματος σε σουλφοροδαμίνη Β και κατόπιν υπολογίζεται η μέση περιεκτικότητα σε χρωστική για τις επαναλήψεις. Οι μέσες τιμές δέσμευσης χρωστικής γίνονται αποδεκτές εφόσον οι σύγχρονες τιμές που έχουν προκύψει για την ουσία μάρτυρα περικλείονται στις αποδεκτές για τη μέθοδο περιοχές τιμών. Οι υποδεικνυόμενες αποδεκτές περιοχές τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική για τις ουσίες μάρτυρες, για τη μεθοδολογία και για τη συσκευασία που περιγράφονται έχουν ως εξής:

Μάρτυρας	Ουσία	Περιοχή τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική (μg/δίσκο)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ 36%	40 – 100
Αρνητικός	Αποσταγμένο νερό	15 – 35

1.5.3.4 Πρόσθετες πληροφορίες

Οι ελεγχόμενες ουσίες μπορούν να εφαρμόζονται στους δίσκους δέρματος για βραχύτερα χρονικά διαστήματα (π.χ. 2 ώρες) προκειμένου να εντοπίζονται υλικά που προκαλούν ισχυρή διάβρωση. Η μελέτη επικύρωσης, ωστόσο, κατέδειξε ότι η δοκιμασία TER οδήγησε σε υπερεκτίμηση του διαβρωτικού δυναμικού διαφόρων ελεγχόμενων χημικών ουσιών μετά τη διατήρησή τους σε επαφή με τους δίσκους δέρματος επί δύο ώρες (2), ενώ με την εικοσιτετράωρη διαδικασία επέτρεψε τον ορθό προσδιορισμό των διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ουσιών.

Τα χαρακτηριστικά και οι διαστάσεις της χρησιμοποιούμενης συσκευής καθώς και η ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία μπορούν να επηρεάσουν τις λαμβανόμενες τιμές TER. Το κατώτατο όριο διάβρωσης των 5 kΩ υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν με τη συγκεκριμένη συσκευή και διαδικασία που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο. Σε περίπτωση σημαντικής μεταβολής των συνθηκών της δοκιμής είναι δυνατόν να ισχύουν διαφορετικά όρια και τιμές για τους μάρτυρες. Ως εκ τούτου, συνιστάται διακρίβωση της μεθοδολογίας και του κατώτατου ορίου αντίστασης μέσω της διεξαγωγής δοκιμών με σειρά προτύπων διαλυμάτων αναφοράς τα οποία θα επιλεγούν μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (3).

1.6 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕ ΟΜΟΙΩΜΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται τοπικά επί 4 ώρες κατ' ανώτατο όριο, στο τρισδιάστατο ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος το οποίο περιλαμβάνει αναπλασθείσα επιδερμίδα με λειτουργική κερατίνη στοιβάδα. Τα διαβρωτικά υλικά ταυτοποιούνται με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας (όπως προσδιορίζεται π.χ. με τη δοκιμασία αναγωγής του MTT) σε επίπεδα χαμηλότερα των καθορισθέντων κατωτάτων ορίων σε συγκεκριμένες περιόδους έκθεσης. Η αρχή της δοκιμασίας στηρίζεται στο σκεπτικό ότι διαβρωτικές χημικές ουσίες είναι εκείνες που μπορούν να διεισδύσουν στην κερατίνη στοιβάδα (με διάχυση ή διάβρωση) και είναι αρκούντως κυτταροτοξικές ώστε να προκαλούν το θάνατο των κυττάρων στις υποκείμενες κυτταρικές στοιβάδες.

1.7 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ – ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΜΕ ΟΜΟΙΩΜΑ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1.7.1 Ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος

Τα ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος είναι δυνατόν να προέρχονται από διάφορες πηγές, αλλά πρέπει να ικανοποιούν ορισμένα κριτήρια. Το ομοίωμα πρέπει να έχει μια λειτουργική κερατίνη στοιβάδα με υπόστρωμα ζώντων κυττάρων. Η φρακτική λειτουργία της κερατίνης στοιβάδας πρέπει να είναι επαρκής. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί καταδεικνύοντας την αντοχή του ομοιώματος στην κυτταροτοξικότητα μετά την εφαρμογή ουσιών οι οποίες είναι γνωστές ως κυτταροτοξικές αλλά δεν διαπερνούν την κερατίνη στοιβάδα. Πρέπει επίσης να καταδεικνύεται ότι με το ομοίωμα αυτό λαμβάνονται αναπαραγώγιμα αποτελέσματα υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Η βιωσιμότητα των ζώντων κυττάρων του ομοιώματος πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να γίνεται σαφής διάκριση μεταξύ των θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Η κυτταρική βιωσιμότητα (όπως προκύπτει, επί παραδείγματι, από τη μέτρηση των επιπέδων του αναχθέντος MTT, δηλαδή σε τιμή οπτικής πυκνότητας) μετά την έκθεση σε αρνητικό μάρτυρα πρέπει να εμπίπτει στα αποδεκτά όρια για το συγκεκριμένο ομοίωμα. Ομοίως, οι τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας που λαμβάνονται με θετικό μάρτυρα (έναντι των αντίστοιχων που λαμβάνονται με αρνητικό μάρτυρα) πρέπει να βρίσκονται εντός καθορισμένων ορίων. Το χρησιμοποιούμενο προγνωστικό μοντέλο πρέπει να ανταποκρίνεται απαραίτητως στα διεθνή πρότυπα επικύρωσης.

1.7.2 Διαδικασία δοκιμής

1.7.2.1 Εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού

Προκειμένου για υγρά υλικά, χρησιμοποιείται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτει την επιφάνεια του δέρματος (τουλάχιστον 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Προκειμένου για στερεά υλικά, χρησιμοποιείται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτει το δέρμα και στη συνέχεια η στερεά ουσία υγραίνεται για να εξασφαλιστεί καλή επαφή με το δέρμα. Εφόσον απαιτείται, τα στερεά κονιοποιούνται πριν από την χρησιμοποίησή τους. Η μέθοδος εφαρμογής πρέπει να είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών (βλ. υποσημείωση 2). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης το ελεγχόμενο υλικό εκπλύνεται επιμελώς από την επιφάνεια του δέρματος με αλατούχο διάλυμα.

1.7.2.2 Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

Για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί οιαδήποτε επικυρωμένη ποσοτική μέθοδος. Η πλέον χρησιμοποιούμενη δοκιμασία είναι η αναγωγή MTT η οποία παρείχε ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα σε διάφορα εργαστήρια (2). Ο δίσκος δέρματος εμβαπτίζεται σε διάλυμα MTT συγκέντρωσης 0,3 mg/ml στους 20-28°C επί 3 ώρες. Το προκύπτον κυανού ιζήμα formazan εκχυλίζεται (εκχύλιση με διαλύτη) και η συγκέντρωση της formazan υπολογίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 545 και 595 nm.

1.7.2.3 Πρόσθετες πληροφορίες

Το είδος του χρησιμοποιηθέντος ομοιώματος δέρματος και το ακριβές πρωτόκολλο του χρόνου έκθεσης και των διαδικασιών έκπλυσης κ.λπ. επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τα σχετικά με την κυτταρική βιωσιμότητα αποτελέσματα. Συνιστάται διακρίβωση της μεθοδολογίας και του προγνωστικού μοντέλου μέσω της διεξαγωγής δοκιμών με σειρά προτύπων διαλυμάτων αναφοράς τα οποία επιλέγονται μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ΕΚΕΕΜ (3). Η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος είναι απαραίτητο να έχει αποδειχθεί αναπαραγώγιμη εντός και μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων για ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα. Η μέθοδος πρέπει να ανταποκρίνεται τουλάχιστον στα κριτήρια επιστημονικής επικύρωσης που καθορίζονται προηγουμένως (2) και τα αποτελέσματα της μελέτης επικύρωσης να δημοσιεύονται σε έγκυρο επιστημονικό περιοδικό του οποίου τα άρθρα εγκρίνονται από ομότιμους αξιολογητές.

2. ΔΕΛΟΜΕΝΑ

2.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

2.1.1 Δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

Οι τιμές ηλεκτρικής αντίστασης σε kΩ του ελεγχόμενου υλικού, των θετικών και αρνητικών μαρτύρων και τυχόν προτύπων χημικών ουσιών αναφοράς πρέπει να παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα, όπου θα περιλαμβάνονται επίσης δεδομένα για τα επαναληπτικά πειράματα, μέσες τιμές και η προκύπτουσα ταξινόμηση.

2.1.2 Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

Οι τιμές οπτικής πυκνότητας και τα υπολογισθέντα δεδομένα εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας για το ελεγχόμενο υλικό, τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τυχόν πρότυπες χημικές ουσίες αναφοράς πρέπει να παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα, όπου περιλαμβάνονται επίσης δεδομένα για τα επαναληπτικά πειράματα, μέσες τιμές και η προκύπτουσα ταξινόμηση.

2.2 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

2.2.1 Δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

Όταν η μέση τιμή TER που λαμβάνεται για την ελεγχόμενη ουσία υπερβαίνει τα 5 kΩ τότε η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται διαβρωτική. Εάν η τιμή TER είναι μικρότερη ή ίση των 5 kΩ, η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται διαβρωτική εφόσον δεν πρόκειται για τασιενεργό ουσία ή ουδέτερη οργανική ένωση.

Για τασιενεργές ουσίες ή ουδέτερες οργανικές ενώσεις για τις οποίες λαμβάνονται τιμές TER μικρότερες ή ίσες των 5 kΩ, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διείσδυσης χρωστικής. Εάν η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική υπερβαίνει ή ισούται με την αντίστοιχη μέση περιεκτικότητα σε χρωστική που προκύπτει ταυτόχρονα για το θετικό μάρτυρα 36% υδροχλώριο, τότε το λαμβανόμενο αποτέλεσμα για την ελεγχόμενη ουσία είναι πραγματικά θετικό και η ουσία θεωρείται επομένως διαβρωτική. Εάν η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική είναι μικρότερη από την αντίστοιχη μέση περιεκτικότητα σε χρωστική που προκύπτει ταυτόχρονα για το θετικό μάρτυρα 36% υδροχλώριο, τότε το λαμβανόμενο αποτέλεσμα για την ελεγχόμενη ουσία είναι ψευδοθετικό και η ουσία δεν είναι επομένως διαβρωτική.

2.2.2 Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

Η τιμή οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα αντιπροσωπεύει κυτταρική βιωσιμότητα 100%. Ως εκ τούτου οι λαμβανόμενες για το ελεγχόμενο δείγμα τιμές οπτικής πυκνότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας βιωσιμότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η διαχωριστική τιμή εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας βάσει της οποίας γίνεται διάκριση μεταξύ διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ελεγχόμενων υλικών (ή μεταξύ των διαφόρων βαθμών διάβρωσης) πρέπει να καθορίζεται σαφώς στο προγνωστικό μοντέλο πριν από την επικύρωση της μεθόδου, και η πραγματοποιούμενη στη συνέχεια μελέτη επικύρωσης πρέπει να καταδεικνύει την καταλληλότητα της διαχωριστικής αυτής τιμής (π.χ. βλ. υποσημείωση 2).

3. ΕΚΘΕΣΕΙΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες

Ελεγχόμενη ουσία:

- ταυτοποίηση, φυσική κατάσταση και, κατά περίπτωση, φυσικοχημικές ιδιότητες. Ανάλογες πληροφορίες πρέπει να παρέχονται για τις τυχόν χρησιμοποιούμενες ουσίες αναφοράς.

Συνθήκες δοκιμής:

- λεπτομερής περιγραφή της διαδικασίας δοκιμής που ακολουθήθηκε.
- περιγραφή και αιτιολόγηση τυχόν τροποποιήσεων.

Αποτελέσματα:

- παρουσίαση σε πίνακα των τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (δοκιμασία TER) ή των τιμών εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας (δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος) που ελήφθησαν για το ελεγχόμενο υλικό, τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τυχόν πρότυπες χημικές ουσίες αναφοράς, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων που προέκυψαν από τα επαναληπτικά πειράματα και των μέσων τιμών·
- περιγραφή τυχόν άλλων επιπτώσεων που παρατηρήθηκαν.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων

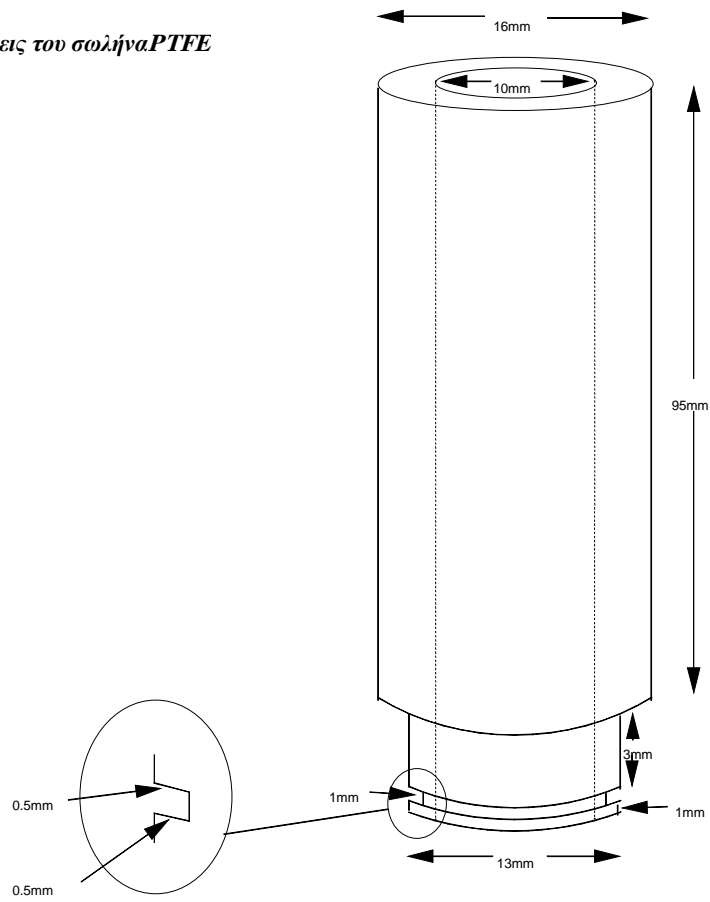
Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

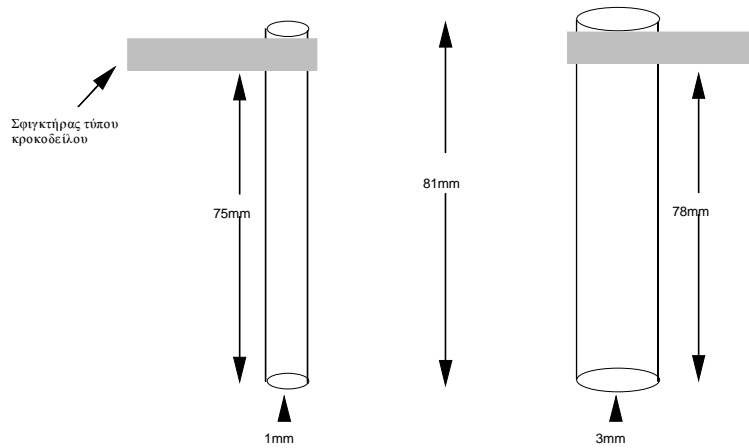
1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275-280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation 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., Ponec, 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.

Σχήμα 1

Διαστάσεις του σωλήνα PTFE

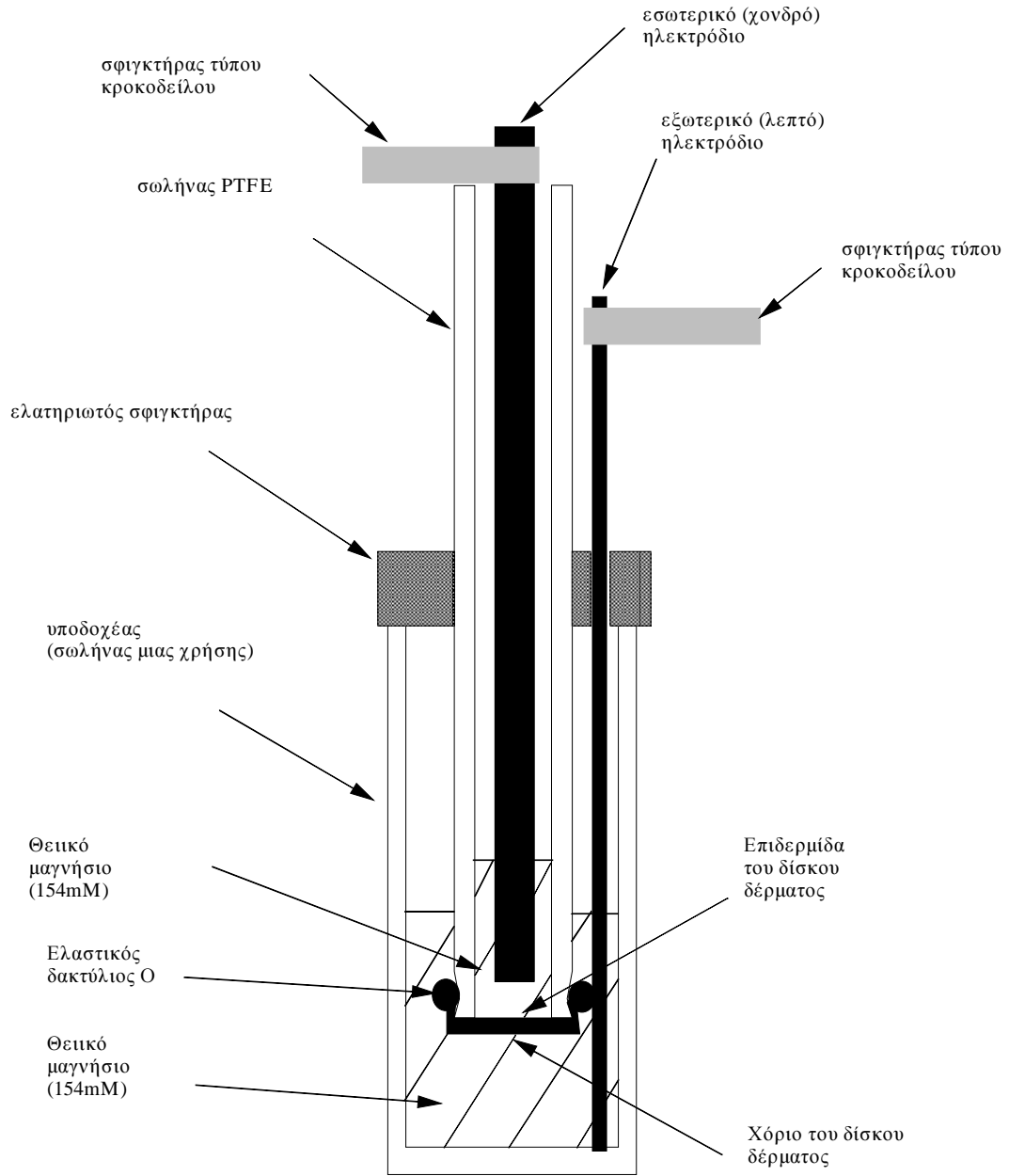


Διαστάσεις των ηλεκτροδίων



Σχήμα 2

Συσκευή για τη δοκιμασία *TER* δέρματος επίμονος



B. 41. ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ - *IN VITRO* 3T3 NRU ΔΟΚΙΜΗ ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ως φωτοτοξικότητα ορίζεται η τοξική απόκριση που εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως ή που επάγεται ομοίως από ακτινοβόληση του δέρματος έπειτα από συστηματική χορήγηση μιας χημικής ουσίας.

Τα στοιχεία που λαμβάνονται από την *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της φωτοτοξικής δυνατότητας μιας υπό δοκιμή ουσίας, δηλ. της ύπαρξης ή απουσίας πιθανών κινδύνων που μπορεί να εμφανιστούν από μια υπό δοκιμή ουσία σε συνδυασμό με έκθεση στο υπεριώδες και το ορατό φως.

Δεδομένου ότι το τοξικολογικό τελικό αποτέλεσμα της *in vitro* δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της *φωτοκυτταροτοξικότητας*, που προκαλείται από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και φωτός, ενώσεις που είναι φωτοτοξικές *in vivo* έπειτα από συστηματική εφαρμογή και κατανομή στο δέρμα, καθώς επίσης και ενώσεις που δρουν ως φωτοερεθιστικά έπειτα από τοπική εφαρμογή στο δέρμα, μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη δοκιμή.

Η *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σε κοινό πρόγραμμα ΕΕ/COLIPA από το 1992-1997 (1)(2)(3) που απέβλεπε στην καθιέρωση μιας έγκυρης *in vitro* εναλλακτικής λύσης αντί των διαφόρων *in vivo* χρησιμοποιούμενων δοκιμών. Το 1996 σε συνάντηση εργασίας του ΟΟΣΑ προτάθηκε μια *in vitro* προσέγγιση διαδοχικών σταδίων ελέγχου για την εκτίμηση της φωτοτοξικότητας (4).

Τα αποτελέσματα της *in vitro* 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας συγκρίθηκαν με τις *in vivo* οξείες φωτοτοξικές/φωτοερεθιστικές επιδράσεις σε ζώα και ανθρώπους, και η δοκιμή αποδείχθηκε ότι παρείχε εξαιρετικές προβλέψεις ως προς τις επιδράσεις αυτές. Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για την πρόβλεψη άλλων δυσμενών επιδράσεων που μπορεί να προκύψουν από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και του φωτός, π.χ. *φωτογονιδιοτοξικότητας*, *φωτοαλλεργίας* και *φωτοκαρκινογένεσης*, αν και πολλές ουσίες που παρουσιάζουν τα ειδικά αυτά χαρακτηριστικά αντιδρούν θετικά στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας. Επιπλέον, η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί κατά τρόπο που να μπορεί να γίνεται εκτίμηση της *φωτοτοξικής ισχύος*.

Στο Παράρτημα 1 δίνεται μια προσέγγιση διαδοχικών σταδίων ελέγχου της φωτοτοξικότητας χημικών ουσιών.

1.2 ΟΡΙΣΜΟΙ

Ένταση ακτινοβολίας: η ένταση του προσπίπτοντος σε μια επιφάνεια υπεριώδους (UV) ή ορατού φωτός, μετρούμενη σε W/m^2 ή mW/cm^2 .

Δόση φωτός: η ποσότητα (= ένταση \times χρόνος) υπεριώδους (UV) ή ορατής ακτινοβολίας προσπίπτουσας σε επιφάνεια, εκφραζόμενη σε Joules (= $W \times s$) ανά μονάδα επιφάνειας, π.χ. J/m^2 ή J/cm^2 .

Ζώνες UV φωτός: Οι χαρακτηρισμοί που προτείνονται από την CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) είναι: UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) και UVC (100-280nm). Χρησιμοποιούνται επίσης και ορισμένοι άλλοι χαρακτηρισμοί: το διαχωριστικό σημείο μεταξύ UVB και UVA τοποθετείται συχνά στα 320nm, ενώ η UVA μπορεί να χωρίζεται σε UV-A1 και UV-A2 με την υποδιαίρεση στα 340nm περίπου.

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος που μετράει τη συνολική δραστικότητα ενός κυτταρικού πληθυσμού (π.χ. πρόσληψη της ζωτικής χρωστικής Neutral Red σε κυτταρικά λυσοσώματα) η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό αποτέλεσμα και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό της δοκιμής, συσχετίζεται με το συνολικό αριθμό και/ή ζωτικότητα των κυττάρων.

Σχετική κυτταρική βιωσιμότητα: η κυτταρική βιωσιμότητα εκφραζόμενη σε σχέση με αρνητικούς (διαλύτες) μάρτυρες που έχουν περάσει από όλη τη διαδικασία δοκιμής (είτε +UV, είτε -UV), αλλά δεν έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία με υπό δοκιμή ουσία.

Μοντέλο πρόβλεψης: αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων μιας δοκιμής τοξικότητας σε πρόβλεψη της τοξικής δυνατότητας. Στα πλαίσια των κατευθυντηρίων γραμμών της παρούσας δοκιμής, για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων της *in vitro* 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας σε πρόβλεψη των φωτοτοξικών δυνατοτήτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι PIF και MPE.

PIF (Photo Irritation Factor - Συντελεστής φωτοερεθισμού): συντελεστής που λαμβάνεται συγκρίνοντας δύο εξίσου αποτελεσματικές κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (EC_{50}) της υπό δοκιμή ουσίας απουσία (-UV) και παρουσία (+UV) μη κυτταροτοξικής ακτινοβολήσης με UVA/ορατό φως.

MPE (Mean Photo Effect – Μέση φωτοεπίδραση): νέο μέτρο που προέρχεται από μαθηματική ανάλυση του πλήρους σχήματος δύο καμπυλών συγκέντρωσης απόκρισης απουσία (-UV) και παρουσία (+UV) μη κυτταροτοξικής ακτινοβολήσης με UVA/ορ.φως.

Φωτοτοξικότητα: οξεία τοξική απόκριση που εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως, ή η οποία επάγεται ομοίως από ακτινοβολήση του δέρματος έπειτα από συστηματική χορήγηση μιας χημικής ουσίας.

Φωτοερεθισμός: υποδιαίρεση του όρου 'φωτοτοξικότητα', που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μόνον τις φωτοτοξικές εκείνες αντιδράσεις που προκαλούνται στο δέρμα έπειτα από έκθεση σε χημικές ουσίες (τοπικά ή από το στόμα). Οι φωτοτοξικές αυτές αντιδράσεις έχουν πάντοτε ως αποτέλεσμα τη μη εξειδικευμένη καταστροφή κυττάρων (αντιδράσεις όπως τα ηλιακά εγκαύματα).

Φωτοαλλεργία: επίκτητη ανοσολογική αντίδραση, που δεν εμφανίζεται στην πρώτη επαφή με χημική ουσία και φως, και χρειάζεται επαγωγικό χρονικό διάστημα μιας ή δύο εβδομάδων πριν να εμφανιστεί δερματική αντίδραση.

Φωτογονιδιοτοξικότητα: παρατηρούμενη γονιδιοτοξική απόκριση με γενετικό τελικό αποτέλεσμα, που εμφανίζεται μετά την έκθεση κυττάρων σε μη γονιδιοτοξική δόση UV/ορατού φωτός και μη γονιδιοτοξική χημική ουσία.

Φωτοκαρκινογένεση: καρκινογένεση προκαλούμενη από επανειλημμένη χρήση φωτός και χημικής ουσίας. Εφόσον τυχόν από UV προκαλούμενη ογκογένεση ενισχύεται από χημική ουσία, τότε χρησιμοποιείται ο όρος 'φωτο συγκαρκινογένεση'.

1.3 ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Εκτός από τον θετικό χημικό μάρτυρα *χλωροπρομαζίνη*, που θα πρέπει να δοκιμάζεται ταυτόχρονα σε κάθε δοκιμή, σε περιπτώσεις πρώτης εφαρμογής της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU συνιστάται να χρησιμοποιούνται ως ουσίες αναφοράς και ορισμένες από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε διεργαστηριακές δοκιμές με την παρούσα δοκιμή (1)(3)(13).

1.4 ΑΡΧΙΚΕΣ ΘΕΩΡΗΣΕΙΣ

Υπάρχουν διάφοροι τύποι χημικών ουσιών που έχουν αναφερθεί ως φωτοτοξικές (5)(6)(7)(8). Το μόνο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να απορροφούν φωτεινή ενέργεια στην περιοχή του ηλιακού φωτός. Σύμφωνα με τον πρώτο νόμο της φωτοχημείας (Grotthaus-Draper's Law) η φωτοαντίδραση απαιτεί επαρκή απορρόφηση κβάντων φωτός. Έτσι, πριν από το βιολογικό έλεγχο σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της παρούσας δοκιμής, θα πρέπει να προσδιορίζεται το φάσμα απορρόφησης UV/ορατού της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. σύμφωνα με την OECD Test Guideline 101). Εάν ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης / απορρόφησης είναι μικρότερος από $10 \text{ λίτρα} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, η χημική ουσία δεν έχει φωτοαντιδραστικές δυνατότητες και δεν χρειάζεται να ελεγχθεί με την *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας ή οποιαδήποτε άλλη βιολογική δοκιμή για δυσμενείς φωτοχημικές επιδράσεις (Παράρτημα 1).

1.5 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

Έχουν εντοπιστεί τέσσερις μηχανισμοί με τους οποίους η απορρόφηση φωτός από μια χρωμοφόρο χημική ένωση μπορεί να οδηγήσει σε φωτοτοξική απόκριση (7). Όλοι απολήγουν σε καταστροφή των κυττάρων. Συνεπώς, η *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας βασίζεται σε σύγκριση της κυτταροτοξικότητας μιας χημικής ουσίας όταν υποβάλλεται σε δοκιμή με και χωρίς έκθεση σε μη κυτταροτοξική δόση UVA/ορατού φωτός. Η κυτταροτοξικότητα σε αυτή τη δοκιμή εκφράζεται με τη μορφή εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση μείωσης της πρόσληψης της ζωτικής χρωστικής, Neutral Red (NR, (9)) 24 ώρες μετά την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία και ακτινοβολήση.

Κύτταρα Balb/c 3T3 διατηρούνται σε καλλιέργεια για 24 ώρες για το σχηματισμό μονοστιβάδων. Στη συνέχεια, δύο τρυβλία με 96 κοιλότητες ανά δοκιμαζόμενη ουσία προεπωάζονται με οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας για 1 h. Στη συνέχεια, ένα από τα δύο τρυβλία εκτίθεται σε μη κυτταροτοξική δόση UVA/ορ.φωτός 5 J/cm² UVA (πείραμα +UV), ενώ το άλλο τρυβλίο διατηρείται στο σκοτάδι (πείραμα -UV). Και στα δύο τρυβλία, το μέσον αγωγής αντικαθίσταται κατόπιν από μέσον καλλιέργειας και έπειτα από 24 ακόμη ώρες επώασης, προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα με Neutral Red Uptake (NRU) για 3 h. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα, εκφραζόμενη ως ποσοστό μη υποβληθέντων σε αγωγή αρνητικών μαρτύρων, υπολογίζεται για κάθε μία από τις οκτώ συγκεντρώσεις δοκιμής. Για την πρόβλεψη της φωτοτοξικής δυνατότητας, οι κατά συγκέντρωση αποκρίσεις που λαμβάνονται με (+UV) και χωρίς (-UV) ακτινοβολία συγκρίνονται, συνήθως στα επίπεδα EC₅₀, δηλ. στη συγκέντρωση που αναστέλει την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50% σε σύγκριση με τους μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες.

1.6 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Κυτταρική ευαισθησία σε UVA, ιστορικά στοιχεία: Τα κύτταρα θα πρέπει κανονικά να ελέγχονται ως προς την ευαισθησία τους σε UVA. Κύτταρα διασπείρονται υπό πυκνότητα που χρησιμοποιείται και στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας, την επόμενη ημέρα ακτινοβολούνται με δόσεις UVA από 1-9 J/cm², και η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται μια ημέρα αργότερα χρησιμοποιώντας τη δοκιμή NRU. Τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια ποιότητας, εάν η βιωσιμότητά τους μετά την ακτινοβολήση με 5 J/cm² UVA δεν είναι μικρότερη από το 80% της βιωσιμότητας των διατηρηθέντων στο σκοτάδι μαρτύρων. Στη μέγιστη δόση UVA των 9 J/cm², η βιωσιμότητα δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 50% εκείνης των διατηρηθέντων στο σκότος μαρτύρων. Ο έλεγχος αυτός θα πρέπει να επαναλαμβάνεται έπειτα από κάθε 10 περίπου διελεύσεις των κυττάρων.

Ευαισθησία στο UVA των αρνητικών κυτταρικών μαρτύρων, τρέχουσα δοκιμή: Η δοκιμή πληροί τα ποιοτικά κριτήρια εάν οι αρνητικοί μάρτυρες (κύτταρα σε Earl's Balanced Salt Solution (EBSS) με ή χωρίς 1% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ή 1% αιθανόλη (EtOH)) στο +UVA πείραμα εμφανίζουν βιωσιμότητα όχι μικρότερη από το 80% εκείνης μη ακτινοβλημένων κυττάρων στον ίδιο διαλύτη του συμπαρομαρτούντος πειράματος στο σκοτάδι (-UVA).

Βιωσιμότητα αρνητικών μαρτύρων: Η απόλυτη οπτική πυκνότητα (OD₅₄₀ NRU) μετρούμενη στο εκχύλισμα NR των αρνητικών μαρτύρων δείχνει αν τα 1×10⁴ κύτταρα ανά κοιλότητα αναπύχθηκαν με κανονικό χρόνο διπλασιασμού κατά τη διάρκεια των δύο ημερών της δοκιμής. Μια δοκιμή πληροί τα κριτήρια αποδοχής εάν η μέση OD₅₄₀ NRU των μη υποβληθέντων σε αγωγή μαρτύρων είναι ≥ 0.2

Θετικός μάρτυρας: Σε κάθε *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας πρέπει να εξετάζεται συγχρόνως και μια γνωστή φωτοτοξική χημική ουσία. Στη μελέτη επικύρωσης των EE/COLIPA ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε γλωροπρομαζίνη (CPZ) η οποία και επομένως προτείνεται. Στην περίπτωση CPZ που εξετάζεται με το τυπικό πρωτόκολλο στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας, ορίστηκαν τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής δοκιμής: CPZ ακτινοβλημένη (+UVA): EC₅₀= 0.1 έως 2.0 μg/ml, CPZ μη ακτινοβλημένη (-UVA): EC₅₀ = 7.0 έως 90.0 μg/ml. Ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF), δηλ. η μεταβολή της EC₅₀ θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 6.

Ως συμπαρομαρτούντες θετικοί μάρτυρες, αντί της CPZ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες γνωστές φωτοτοξικές χημικές ουσίες, κατάλληλες για τη χημική τάξη ή τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας της αξιολογούμενης υπό δοκιμή ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, με βάση ιστορικά δεδομένα, θα πρέπει να οριστούν κατάλληλα οι περιοχές των τιμών EC₅₀ και ο PIF ή η MPE (Mean Photo Effect) ως κριτήρια αποδοχής για τη δοκιμή.

1.7 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.7.1 Παρασκευάσματα

1.7.1.1 Κύτταρα

Στη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκε μόνιμη κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού - Balb/c 3T3, κλώνος 31 – είτε από την ATCC είτε από την ECACC, η οποία επομένως και προτείνεται. Στο ίδιο πρωτόκολλο δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου επιτυχώς και άλλα κύτταρα ή κυτταρικές σειρές, εφόσον οι συνθήκες καλλιέργειας είναι προσαρμοσμένες στις ειδικές ανάγκες των κυττάρων, πρέπει όμως να καταδεικνύεται η ισοδυναμία.

Τα κύτταρα θα πρέπει κανονικά να ελέγχονται μήπως είναι μολυσμένα από μυκόπλασμα και να χρησιμοποιούνται μόνον εφόσον τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού είναι ικανοποιητικά.

Επειδή η ευαισθησία των κυττάρων σε UVA μπορεί να αυξάνεται με τον αριθμό των διελεύσεων, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κύτταρα Balb/c 3T3 με τον χαμηλότερο δυνατόν αριθμό διελεύσεων, κατά προτίμηση κάτω των 100. Έχει ιδιαίτερη σημασία, η ευαισθησία σε UVA των κυττάρων Balb/c 3T3 να ελέγχεται τακτικά σύμφωνα με τη διαδικασία ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στις παρούσες κατευθυντήριες γραμμές.

1.7.1.2 Μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Για τη συνθήκη διέλευση κυττάρων και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα μέσα καλλιέργειας και συνθήκες επώασης. Για κύτταρα Balb/c 3T3, τα μέσα αυτά είναι DMEM με προσθήκη 10% ορού νεογέννητου μωσχαριού, 4 mM γλουταμίνη, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη, και επώαση με υγρασία στους 37°C / 7.5% CO₂. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό, οι συνθήκες της κυτταρικής καλλιέργειας να διασφαλίζουν χρόνο κυτταρικού κύκλου στα κανονικά ιστορικά πλαίσια των χρησιμοποιούμενων κυττάρων ή κυτταρικών σειρών.

1.7.1.3 Ετοιμασία των καλλιερειών

Κύτταρα από κατεψυγμένες αρχικές καλλιέργειες εμβολιάζονται σε μέσον καλλιέργειας στην κατάλληλη πυκνότητα και χωρίζονται σε υποκαλλιέργειες τουλάχιστον μια φορά πριν να χρησιμοποιηθούν στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας.

Για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας, τα κύτταρα εμβολιάζονται σε μέσον καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη φθάνουν σε κατάσταση συρροής μέχρι το τέλος της δοκιμής, δηλ. όταν η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται 48 ώρες μετά τη διασπορά των κυττάρων. Στην περίπτωση κυττάρων Balb/c 3T3 καλλιεργούμενων σε τρυβλία 96 κοιλότητων, η συνιστώμενη κυτταρική πυκνότητα είναι 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα.

Για κάθε δοκιμαζόμενη χημική ουσία, τα κύτταρα εμβολιάζονται με τον ίδιο τρόπο σε δύο χωριστά τρυβλία των 96 κοιλότητων, τα οποία περνούν στη συνέχεια ταυτόχρονα από όλη τη διαδικασία δοκιμής υπό ταυτόσημες συνθήκες καλλιέργειας, εκτός από τη χρονική περίοδο όπου ένα από τα τρυβλία ακτινοβολείται (+UVA/ορ.) και το άλλο διατηρείται στο σκοτάδι (-UVA/ορ.).

1.7.1.4 Μεταβολική ενεργοποίηση

Αν και η χρήση μεταβολικών συστημάτων αποτελεί γενική απαίτηση για όλες τις *in vitro* δοκιμές για την πρόβλεψη γονιδιοτοξικών και καρκινογόνων δυνατοτήτων, μέχρι σήμερα, στην περίπτωση της φωτοτοξικολογίας, δεν υπάρχει καμιά γνωστή χημική ουσία για την οποία να χρειάζεται μεταβολικός μετασχηματισμός προκειμένου η ουσία να δράσει ως φωτοτοξίνη *in vivo* ή *in vitro*. Έτσι, ούτε θεωρείται αναγκαίο ούτε δικαιολογείται επιστημονικά η εκτέλεση της παρούσας δοκιμής με κάποιο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

1.7.1.5 Υπό δοκιμή ουσία / Παρασκευή

Οι υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένες λίγο πριν από τη χρήση τους, εκτός κι αν τα υφιστάμενα στοιχεία σταθερότητας επιτρέπουν την αποθήκευση. Στην περίπτωση που υπάρχει πιθανότητα ταχείας φωτοαποικοδόμησης, μπορεί να απαιτείται παρασκευή με ερυθρό φως.

Οι υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε ρυθμιστικά αλατούχα διαλύματα, π.χ. Earle's Balanced Salt Solution, (EBSS) ή Phosphate Buffered Saline (PBS), τα οποία, για λόγους αποφυγής παρεμβατικών φαινομένων κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης, πρέπει να είναι απηλλαγμένα πρωτεϊνικών συστατικών και χρωστικών δεικτών pH που απορροφούν το φως.

Ουσίες με περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες στο εκατονταπλάσιο της επιθυμητής τελικής συγκέντρωσης και κατόπιν να αραιώνονται 1:100 με το ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλύτης, αυτός πρέπει να υπάρχει σε σταθερό όγκο 1% (v/v) σε όλες τις καλλιέργειες, δηλ. τόσο στους αρνητικούς μάρτυρες όσο και σε όλες τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας.

Ως διαλύτες συνιστώνται το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και η αιθανόλη (EtOH). Κατάλληλοι μπορεί να είναι και άλλοι διαλύτες με χαμηλή κυτταροτοξικότητα (π.χ. ακετόνη), πρέπει όμως να ελέγχονται προσεκτικά μήπως τυχόν εμφανίζουν κάποιες ειδικές ιδιότητες, π.χ. αντιδρούν με την υπό δοκιμή ουσία, παγώνουν την φωτοτοξική επίδραση, ενώνονται με ρίζες, κλπ.

Προς υποβοήθηση της διαλυτοποίησης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί, εφόσον απαιτείται, ανάμιξη με vortex και/ή επίδραση υπερήχων και/ή θέρμανση στους 37°C.

1.7.1.6 *Ακτινοβολία UV / Προετοιμασία*

Φωτεινή πηγή: ο κρισιμότερος παράγοντας στη δοκιμή φωτοτοξικότητας είναι η επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής και κατάλληλου φίλτρου. Η ζώνη UVA και οι ορατές περιοχές σχετίζονται συνήθως με φαινόμενα φωτοευαισθητοποίησης (7)(10), ενώ η UVB σχετίζεται λιγότερο και είναι απευθείας λίαν κυτταροτοξική, η δε κυτταροτοξικότητά της αυξάνεται μέχρι το χυλιαπλάσιο στην περιοχή από 313 έως 280 nm (11). Στα κριτήρια για την επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής θα πρέπει να περιλαμβάνεται ως βασική απαίτηση, τα κύματα που εκπέμπονται από τη φωτεινή πηγή να έχουν μήκος κύματος απορροφούμενο από την υπό δοκιμή ουσία ενώ η φωτεινή δόση (που πρέπει να επιτυγχάνεται μέσα σε λογικό χρονικό διάστημα) θα πρέπει να είναι επαρκής για την ανίχνευση γνωστών φωτοευαισθητοποιητικών ουσιών. Περαιτέρω, τα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος και οι δόσεις δεν θα πρέπει να έχουν ανεπίτρεπτες επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης και της εκπομπής θερμότητας (περιοχή υπερύθρου).

Ως άριστη φωτεινή πηγή θεωρείται η προσομοίωση του ηλιακού φωτός με ηλιακούς προσομοιωτές. Στους ηλιακούς προσομοιωτές χρησιμοποιούνται τόσο τόξα Xenon όσο και (επιχρισμένα) τόξα υδραργύρου-μεταλλοαλογονιδίων. Τα τελευταία έχουν το πλεονέκτημα ότι εκπέμπουν λιγότερη θερμότητα και είναι φθηνότερα, δεν ταιριάζουν όμως απόλυτα με το ηλιακό φως. Επειδή όλοι οι ηλιακοί προσομοιωτές εκπέμπουν σημαντικές ποσότητες UVB, θα πρέπει να φιλτράρονται κατάλληλα ώστε να εξασθενεί η υψηλής κυτταροτοξικότητας ακτινοβολία UVB.

Για την *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας θα πρέπει να χρησιμοποιείται φάσμα ακτινοβολίας απηλλαγμένο πρακτικά από UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Έχει δημοσιευτεί παράδειγμα της κατανομής της φασματικής ακτινοβολίας του φιλτραρισμένου ηλιακού προσομοιωτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επικύρωσης της *in vitro* 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας (3).

Δοσιμετρία: Η ένταση του φωτός (ένταση ακτινοβολίας) θα πρέπει να ελέγχεται κανονικά πριν από κάθε δοκιμή φωτοτοξικότητας, χρησιμοποιώντας κατάλληλο ευρύζωνο υπεριώδιμετρο. Το UV-μετρο πρέπει να διακριβώνεται ως προς την πηγή. Η λειτουργία του UV-μέτρου θα πρέπει να ελέγχεται, και για το σκοπό αυτό, συνιστάται η χρήση ενός δεύτερου UV-μέτρου αναφοράς του ίδιου τύπου και με ταυτόσημη διακρίβωση. Θεωρητικά, κατά μεγάλα διαστήματα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται φασματοακτινόμετρο για να μετριέται η φασματική ακτινοβολία της φιλτραρισμένης φωτεινής πηγής και να ελέγχεται η βαθμονόμηση του ευρύζωνου UV-μέτρου, τα όργανα αυτά όμως απαιτούν χειρισμό μόνον από κατάλληλα εκπαιδευμένα άτομα.

Στη μελέτη επικύρωσης προσδιορίστηκε ότι δόση 5 J/cm² (UVA) δεν παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα για τα κύτταρα Balb/c 3T3, είναι όμως επαρκής για τη διέγερση έστω και ασθενών φωτοτοξικών χημικών ουσιών. Για την επίτευξη 5 J/cm² εντός χρονικού διαστήματος 50 min, η ένταση της ακτινοβολίας πρέπει να προσαρμόζεται στα 1.666 mW/cm². Εφόσον χρησιμοποιηθεί άλλη κυτταρική σειρά ή διαφορετική φωτεινή πηγή, η δόση UVA μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί ελαφρώς, με βάση τα κριτήρια της μη δυσμενούς επίδρασης στα κύτταρα και της επάρκειας για την ανίχνευση συνήθων φωτοτοξινών. Ο χρόνος της φωτεινής έκθεσης υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{δόση ακτινοβολίας (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{ένταση ακτινοβολίας (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2 **Συνθήκες δοκιμής**

Η μέγιστη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 100 µg/ml, αφού όλες οι φωτοτοξικές ουσίες ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξάνει η πιθανότητα εμφάνισης εσφαλμένων θετικών αποτελεσμάτων (υπερβολικών προβλέψεων) (13). Το pH της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να είναι ικανοποιητικό (περιοχή pH: 6.5 - 7.8).

Οι περιοχές συγκεντρώσεων μιας χημικής ουσίας που υποβάλλεται σε δοκιμή παρουσία (+UVA) και απουσία (-UVA) φωτός θα πρέπει να προσδιορίζονται κατάλληλα με προηγούμενα πειράματα για εύρεση της περιοχής. Το εύρος και το διάστημα μιας σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να προσαρμόζονται έτσι ώστε οι καμπύλες συγκέντρωσης-απόκρισης να υποστηρίζονται από επαρκή πειραματικά δεδομένα. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά συγκεντρώσεων (με σταθερό συντελεστή αραιώσης).

1.7.3 Διαδικασία δοκιμής¹

1.7.3.1 1η ημέρα

Παρασκευάζεται εναιώρημα κυττάρων με 1×10^5 κύτταρα/ml σε μέσον καλλιέργειας και προστίθενται 100 μL μέσου καλλιέργειας στις περιφερειακές μόνον κοιλότητες ενός μικροτιτλοδοτικού τρυβλίου με 96 κοιλότητες (= λευκά). Στις εναπομένουσες κοιλότητες, προστίθενται 100 μL κυτταρικού εναιωρήματος με 1×10^5 κύτταρα/ml (= 1×10^4 κύτταρα/κοιλότητα). Για κάθε δοκιμαζόμενη ουσία, ετοιμάζονται δύο τρυβλία: ένα για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας (-UVA), και το άλλο για τον προσδιορισμό της φωτοκυτταροτοξικότητας (+UVA).

Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h (7.5% CO_2 , 37°C) έως ότου σχηματίζουν μονοστιβάδα σε επίπεδα ημισυρροής. Η περίοδος αυτή επώασης επιτρέπει την επαναφορά σε κανονική κατάσταση και πρόσφυση των κυττάρων και την εκθετική τους αύξηση.

1.7.3.2 2η ημέρα

Μετά την επώαση, το μέσον καλλιέργειας απομακρύνεται από τα κύτταρα και ακολουθεί διπλή έκπλυση με 150 μL EBSS/PBS ανά κοιλότητα. Προστίθενται 100 μL EBSS/PBS με την κατάλληλη συγκέντρωση ουσίας ή απλώς διαλύτη (αρνητικός μάρτυρας). Χρησιμοποιούνται 8 διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας. Τα κύτταρα επωάζονται με την υπό δοκιμή ουσία στο σκοτάδι για 60 λεπτά (7.5% CO_2 , 37°C).

Για την εκτέλεση του (+UVA) τμήματος της δοκιμής, τα κύτταρα ακτινοβολούνται μέσα από το καπάκι του τρυβλίου με 96 κοιλότητες με 1.7 mW/cm^2 UVA (= 5 J/cm^2). Για την αποφυγή συμπύκνωσης υδρατμών κάτω από το καπάκι χρησιμοποιείται ένας ανεμιστήρας. Διπλά τρυβλία (-UVA) διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε ένα σκοτεινό κουτί για 50 min (= χρόνος έκθεσης UVA).

Το υπό δοκιμή διάλυμα μεταγγίζεται και ακολουθεί έκπλυση δύο φορές με 150 μL EBSS/PBS. Το EBSS/PBS αντικαθίσταται με μέσον καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση (7.5% CO_2 , 37 °C) όλη τη νύκτα (18-22 h).

1.7.3.3 3η ημέρα

Μικροσκοπική αξιολόγηση

Τα κύτταρα εξετάζονται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Καταγράφονται οι μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων που οφείλονται στην κυτταροτοξική επίδραση της υπό δοκιμή ουσίας. Ο έλεγχος αυτός συνιστάται για την αποφυγή πειραματικών λαθών, τα στοιχεία όμως αυτά δεν χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας ή της φωτοτοξικότητας.

Δοκιμή Neutral Red Uptake

Τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 μL προθερμασμένο EBSS/PBS. Το διάλυμα εκπλύσεως απομακρύνεται με ήπια άντληση. Προστίθενται 100 μL μέσου NR και ακολουθεί επώαση στους 37 °C, σε ένυγη ατμόσφαιρα με 7.5% CO_2 , για 3 h.

Μετά την επώαση, το μέσον NR απομακρύνεται και τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 μL EBSS/PBS. Ακολουθεί ολοκληρωτική μετάγγιση και στύπωση του EBSS/PBS. (Προαιρετικός: ανάστροφη φυγοκέντρηση)

Προστίθενται ακριβώς 150 μL διάλυμα εκρόφησης NR (προσφάτως παρασκευασθέν διάλυμα αιθανόλης/οξικού οξέος)

Το μικροτιτλοδοτικό τρυβλίο ανακινείται με ταχύτητα με τη βοήθεια αναταράκτη (σέικερ) μικροτιτλοδοτικών τρυβλίων επί 10 min, μέχρις ότου εκχυλιστεί το NR από τα κύτταρα και σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα.

Μετρίεται η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος NR στα 540 nm με φασματοφωτόμετρο, χρησιμοποιώντας τα λευκά ως σημεία αναφοράς. Τα δεδομένα σώζονται σε κατάλληλη μορφή (π.χ. ASCII) για μεταγενέστερη ανάλυση.

¹ Πρόσθετες λεπτομέρειες μπορούν να βρεθούν στην παραπομπή (12)

2.1 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μπορεί να γίνει ουσιαστική ανάλυση της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης παρουσία και απουσία UVA/ορ. ακτινοβολίας. Εφόσον διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα, τόσο το εύρος των συγκεντρώσεων όσο και το μεταξύ των επιμέρους συγκεντρώσεων διάστημα θα πρέπει να ρυθμίζονται έτσι ώστε να μπορεί να χαραχθεί καμπύλη σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα. Λόγω του ότι μια υπό δοκιμή ουσία μπορεί να μην είναι κυτταροτοξική μέχρι την καθορισμένη οριακή συγκέντρωση των 100 µg/ml στο σκοτεινό πείραμα (-UVA), αλλά λίαν τοξική όταν ακτινοβολείται (+UVA), τα προς έλεγχο εύρη των συγκεντρώσεων και στα δύο μέρη του πειράματος μπορεί να χρειάζεται να διαφέρουν κατά τάξεις μεγέθους ώστε να πληρούται η απαίτηση της κατάλληλης ποιότητας των δεδομένων. Εφόσον δεν διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα και στα δύο μέρη του πειράματος (-UVA and +UVA), αρκεί έλεγχος με μεγάλη απόσταση μεταξύ μεμονωμένων δόσεων μέχρι την υψηλότερη συγκέντρωση.

Δεν χρειάζεται οποιαδήποτε επαλήθευση με επαναληπτικό πείραμα στην περίπτωση σαφούς θετικού αποτελέσματος. Επιπλέον, δεν χρειάζεται να επαληθευτούν ούτε τα σαφή αρνητικά αποτελέσματα, υπό την προϋπόθεση ότι η υπό δοκιμή ουσία εξετάστηκε σε επαρκώς υψηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, αρκεί ένα κύριο πείραμα, επικουρούμενο από ένα ή περισσότερα προκαταρκτικά πειράματα ανεύρεσης εύρους συγκεντρώσεων.

Δοκιμές με οριακά αποτελέσματα κοντά στη γραμμή τομής του μοντέλου πρόβλεψης θα πρέπει να επαναλαμβάνονται για επαλήθευση.

Εφόσον θεωρηθεί αναγκαία η επανάληψη της δοκιμής τότε, για τη λήψη σαφούς αποτελέσματος, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο η διακύμανση των πειραματικών συνθηκών. Μια βασική μεταβλητή στη δοκιμή αυτή είναι η παρασκευή των διαλυμάτων της υπό δοκιμή ουσίας. Συνεπώς, η διακύμανση αυτών των συνθηκών (συνδιάλυτης, λειοτρίβηση, εφαρμογή υπερήχων) μπορεί να έχει ουσιαστική σημασία στην επανάληψη της δοκιμής. Εναλλακτικώς, μπορεί να εξεταστεί και η διακύμανση του προ της ακτινοβολήσεως χρόνου επώασεως. Η βράχυνση του χρόνου μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση υδατοασταθών χημικών ουσιών.

2.2 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όπου είναι δυνατόν, προσδιορίζεται η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή ουσίας που παρουσιάζει 50% αναστολή της κυτταρικής NRU (EC₅₀). Αυτό μπορεί να γίνει εφαρμόζοντας οποιαδήποτε κατάλληλη διαδικασία μη γραμμικής αναγωγής (κατά προτίμηση Hill ή λογιστική αναγωγή) στα δεδομένα συγκέντρωσης-απόκρισης, ή χρησιμοποιώντας άλλες διαδικασίες προσαρμογής (14). Πριν χρησιμοποιηθεί κάποια τιμή EC₅₀ για περαιτέρω υπολογισμούς, θα πρέπει να ελέγχεται κατάλληλα η ποιότητα της προσαρμογής. Εναλλακτικώς, για τον υπολογισμό της EC₅₀ μπορούν να χρησιμοποιηθούν γραφικές μέθοδοι προσαρμογής. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται η χρήση χάρτου πιθανοτήτων (x-κλίμακα: log, y-κλίμακα: probit), καθώς σε πολλές περιπτώσεις η συνάρτηση συγκέντρωσης-απόκρισης καθίσταται σχεδόν γραμμική μετά το μετασχηματισμό αυτό..

2.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ (ΜΟΝΤΕΛΛΑ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ)

2.3.1 Μοντέλο πρόβλεψης έκδοση 1: Συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF)

Εάν τόσο παρουσία (+UVA) όσο και απουσία (-UVA) φωτός, λαμβάνονται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης απόκρισης, ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF) υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Τιμή PIF < 5, σημαίνει μη φωτοτοξική δυνατότητα, τιμή PIF ≥ 5 σημαίνει φωτοτοξική δυνατότητα.

Εάν μια χημική ουσία είναι κυτταροτοξική μόνο υπό συνθήκες +UVA και μη κυτταροτοξική όταν δοκιμάζεται υπό συνθήκες -UVA, ο PIF δεν μπορεί να υπολογιστεί, αν και αυτό είναι ένα αποτέλεσμα που δείχνει φωτοτοξική δυνατότητα. Στις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να υπολογιστεί μια τιμή "> PIF" εάν η δοκιμή κυτταροτοξικότητας (-UV) εκτελεστεί μέχρι την ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής (C_{max}) οπότε αυτή η τιμή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της "> PIF":

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{\max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Εάν μπορεί να ληφθεί μόνον τιμή "> PIF", τότε κάθε τιμή >1 προλέγει φωτοτοξική δυνατότητα.

Εάν δεν μπορούν να υπολογιστούν ούτε η EC₅₀ (-UV) ούτε η EC₅₀ (+UV) λόγω του ότι η χημική ουσία δεν δείχνει καμία κυτταροτοξικότητα μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμή, αυτό δείχνει την μη ύπαρξη φωτοτοξικής δυνατότητας. Στις περιπτώσεις αυτές, για τον χαρακτηρισμό του αποτελέσματος χρησιμοποιείται ένα τυπικό "PIF = *1"

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{\max}(-UV)}{C_{\max}(+UV)}$$

Εάν μπορεί να ληφθεί μόνο μια τιμή "PIF = *1", αυτό σημαίνει τη μη ύπαρξη φωτοτοξικής δυνατότητας.

Στις περιπτώσεις (b) και (c), θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη οι συγκεντρώσεις που λαμβάνονται στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας προκειμένου να προβλεφθεί η φωτοτοξική δυνατότητα

2.3.2 Μοντέλο πρόβλεψης έκδοση 2: Μέση φωτοεπίδραση (MPE)

Εναλλακτικώς, μπορεί να εφαρμοστεί και μια νέα έκδοση του μοντέλου για την πρόβλεψη της φωτοτοξικής δυνατότητας, που έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας δεδομένα της μελέτης επικύρωσης των EE/COLIPA (15) και δοκιμάσται υπό τυφλές συνθήκες σε μεταγενέστερη μελέτη για την *in vitro* φωτοτοξικότητα χημικών φίλτρων UV (13). Το μοντέλο αυτό υπερπηδά τον περιορισμό του μοντέλου PIF στις περιπτώσεις που δεν μπορεί να ληφθεί τιμή EC₅₀. Το μοντέλο χρησιμοποιεί τη "μέση φωτοεπίδραση" (MPE), μέτρο το οποίο βασίζεται σε σύγκριση των πλήρων καμπυλών συγκέντρωσης απόκρισης. Για την εφαρμογή του μοντέλου MPE, αναπτύχθηκε στο Humboldt University (Berlin, D) ένα ειδικό λογισμικό που μπορεί να παραληφθεί δωρεάν.

2.4 ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θετικό αποτέλεσμα στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας (PIF ≥ 5 ή MPE ≥ 0.1) σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία έχει φωτοτοξική δυνατότητα. Εάν το αποτέλεσμα αυτό λαμβάνεται σε συγκεντρώσεις κάτω των 10 µg/ml, η υπό δοκιμή ουσία είναι επίσης πιθανόν να δρα και ως φωτοτοξίνη και υπό ποικίλες συνθήκες έκθεσης *in vivo*. Εάν ληφθεί θετικό αποτέλεσμα μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμή των 100 µg/mL, για την εκτίμηση των κινδύνων ή της φωτοτοξικής ισχύος μπορεί να απαιτείται να ληφθούν υπόψη και άλλα στοιχεία. Σε αυτά μπορεί να περιλαμβάνονται στοιχεία για τη διείσδυση, την απορρόφηση και πιθανή συσσώρευση της ουσίας στο δέρμα, ή έλεγχος της ουσίας σε επιβεβαιωτική εναλλακτική δοκιμή, π.χ. χρησιμοποιώντας μοντέλο ανθρώπινου δέρματος *in vitro*.

Αρνητικό αποτέλεσμα από την *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας (PIF < 5 ή MPE < 0.1) σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι φωτοτοξική στα καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών υπό τις χρησιμοποιούμενες συνθήκες. Στις περιπτώσεις όπου η ουσία μπόρεσε να δοκιμασθεί μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση των 100 µg/ml, τυχόν αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι η ουσία δεν έχει φωτοτοξική δυνατότητα, η δε φωτοτοξικότητα *in vivo* μπορεί να θεωρηθεί ως απίθανη. Στις περιπτώσεις όπου ελήφθησαν ταυτόσημες αποκρίσεις συγκέντρωσης-τοξικότητας (EC₅₀+UV και EC₅₀-UV) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι η ίδια. Αντιθέτως, αν δεν καταδείχθηκε τοξικότητα (+UV και -UV) αλλά λόγω μειωμένης υδατοδιαλυτότητας της ουσίας οι συγκεντρώσεις περιορίστηκαν σε τιμές χαμηλότερες των 100 µg/ml, τότε μπορεί να τεθεί εν αμφιβολία η συμβατότητα της υπό δοκιμή ουσίας με τη δοκιμή και θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής επιβεβαιωτικής δοκιμασίας (π.χ., χρησιμοποιώντας μοντέλο δέρματος *in vitro*, ή μοντέλο δέρματος *ex vivo* or δοκιμή *in vivo*).

3 ΑΝΑΦΟΡΑ ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή ουσία:

- στοιχεία ταυτοποίησης και αριθ. CAS, εάν είναι γνωστά
- φυσική μορφή και καθαρότητα
- φυσικοχημικές ιδιότητες σχετικές με τη διεξαγωγή της μελέτης
- σταθερότητα και φωτοσταθερότητα, εάν είναι γνωστές

Διαλύτης:

- αιτιολόγηση της επιλογής του διαλύτη
- διαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας στον διαλύτη
- ποσοστό διαλύτη ευρισκόμενο στο μέσο κατεργασίας (EBSS ή PBS)

Κύτταρα:

- τύπος και πηγή κυττάρων
- απουσία μυκοπλάσματος
- αριθμός κυτταρικών διελεύσεων, αν είναι γνωστές
- ευαισθησία των κυττάρων σε UVA, προσδιοριζόμενη με τον εξοπλισμό ακτινοβόλησης που χρησιμοποιείται στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας

Συνθήκες δοκιμής (a) *επώαση πριν και μετά την κατεργασία:*

- τύπος και σύσταση του μέσου καλλιέργειας
- συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO₂, θερμοκρασία, υγρασία)
- διάρκεια της επώασης (προκατεργασία, μετακατεργασία)

Συνθήκες δοκιμής (b) *κατεργασία με την χημική ουσία:*

- σκεπτικό της επιλογής των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας που χρησιμοποιούνται με και χωρίς ακτινοβόληση UV/or.
- σε περίπτωση περιορισμένης διαλυτότητας της υπό δοκιμή ουσίας και απουσίας κυτταροτοξικότητας, σκεπτικό της χρησιμοποιηθείσας υψηλότερης συγκέντρωσης
- τύπος και σύσταση του μέσου κατεργασίας (ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα)
- διάρκεια της χημικής κατεργασίας

Συνθήκες δοκιμής (c) *ακτινοβόληση:*

- σκεπτικό επιλογής της χρησιμοποιούμενης φωτεινής πηγής
- χαρακτηριστικά φασματικής ακτινοβολίας της φωτεινής πηγής
- χαρακτηριστικά διαφάνειας / απορρόφησης του ή των χρησιμοποιούμενων φίλτρων
- χαρακτηριστικά του ακτινομέτρου και λεπτομέρειες διακρίβωσής του
- απόσταση της φωτεινής πηγής από το σύστημα δοκιμής
- ένταση ακτινοβολίας UVA στην απόσταση αυτή, εκφραζόμενη σε mW/cm²
- διάρκεια έκθεσης σε UV/or. φως
- δόση UVA (ένταση ακτινοβολίας × χρόνος), εκφραζόμενη σε J/cm²
- θερμοκρασία χρησιμοποιούμενη στις κυτταρικές καλλιέργειες κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης και στις ταυτόχρονα διατηρούμενες στο σκοτάδι κυτταρικές καλλιέργειες

Συνθήκες δοκιμής (d) *δοκιμή NRU*

- σύσταση του μέσου NR
- διάρκεια επώασης NR
- συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO₂, θερμοκρασία, υγρασία)
- συνθήκες εκχύλισης NR (εκχυλιστικό, διάρκεια)
- μήκος κύματος χρησιμοποιούμενο για την φασματοφωτομετρική ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας NR
- δεύτερο μήκος κύματος (αναφοράς), εφόσο χρησιμοποιείται
- περιεχόμενο λευκού του φασματοφωτομέτρου, εφόσον χρησιμοποιείται

Αποτελέσματα

- κυτταρική βιωσιμότητα λαμβανόμενη σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας, εκφραζόμενη σε ποσοστιαία μέση βιωσιμότητα των μαρτύρων
- καμπύλες συγκέντρωσης - απόκρισης (συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας σε συνάρτηση με τη σχετική κυτταρική βιωσιμότητα), λαμβανόμενες σε ταυτόχρονα πειράματα +UVA και -UVA
- ανάλυση δεδομένων των καμπυλών συγκέντρωσης - απόκρισης: εφόσον είναι δυνατόν, εκτίμηση / υπολογισμός των EC₅₀ (+UVA) και EC₅₀ (-UVA)
- σύγκριση των δύο καμπυλών συγκέντρωσης - απόκρισης που λαμβάνονται με και χωρίς ακτινοβόληση UVA/or., είτε με υπολογισμό του συντελεστή φωτοερεθισμού (PIF), είτε με υπολογισμό της μέσης φωτοεπίδρασης (MPE)
- ταξινόμηση της φωτοτοξικής δυνατότητας
- κριτήρια αποδοχής δοκιμής (a), *ταυτόχροντος αρνητικού μάρτυρα:*
 - απόλυτη βιωσιμότητα (οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος NR) ακτινοβολημένων και μη κυττάρων
 - ιστορικά στοιχεία αρνητικού μάρτυρα, μέση τιμή και τυπική απόκλιση
- κριτήρια αποδοχής δοκιμής (b), *ταυτόχροντος θετικού μάρτυρα:*
 - EC50(+UVA) και EC50(-UVA) και PIF θετικού μάρτυρα
 - ιστορικά στοιχεία θετικού μάρτυρα: EC50(+UVA) και EC50(-UVA) και PIF, μέση τιμή και τυπική απόκλιση

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα

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., Sapora, 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.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

Ρόλος της 3T3 NRU ΔΦ σε μια διαδοχική προσέγγιση του ελέγχου της φωτοτοξικότητας των χημικών ουσιών

