II

(Ikke-lovgivningsmæssige retsakter)

FORORDNINGER

KOMMISSIONENS FORORDNING (EU) Nr. 900/2014

af 15. juli 2014

om ændring med henblik på tilpasning til den tekniske udvikling af forordning (EF) nr. 440/2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH)

(EØS-relevant tekst)

EUROPA-KOMMISSIONEN HAR —

under henvisning til traktaten om Den Europæiske Unions funktionsmåde,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 af 18. december 2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH), om oprettelse af et europæisk kemikalieagentur og om ændring af direktiv 1999/45/EF og ophævelse af Rådets forordning (EØF) nr. 793/93 og Kommissionens forordning (EF) nr. 1488/94 samt Rådets direktiv 76/769/EØF og Kommissionens direktiv 91/155/EØF, 93/67/EØF, 93/105/EF og 2000/21/EF [1], særlig artikel 13, stk. 2, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 [2] indeholder de forsøgsmetoder, der skal anvendes til at bestemme kemikaliers fysisk-kemiske egenskaber, toksicitet og økotoksicitet med henblik på forordning (EF) nr. 1907/2006.

(2) Forordning (EF) nr. 440/2008 bør ajourføres, ved at der med høj prioritet tilføjes en række nye og ajourførte forsøgsmetoder, som OECD har vedtaget for nylig, således at der tages hensyn til den tekniske udvikling og det sikres, at antallet af dyr, der anvendes til dyreforsøg, begrænses til et minimum som krævet i Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU [3]. De interesserede parter er blevet hørt om dette forslag.

(3) Denne tilpasning til den tekniske udvikling indeholder seks nye forsøgsmetoder til bestemmelse af toksicitet og andre sundhedsvirkninger, herunder en metode til undersøgelse af neurotoksicitet under udviklingen, en udvidet 1-generationstest til undersøgelse af reproduktionstoksicitet, en in vivo-genmutationstest i transgene gnavere, en in vitro-test til vurdering af effekten på syntesen af steroidhormoner samt to in vivo-screeningstest til vurdering af østrogene og (anti)-androgene virkninger.

(4) Forordning (EF) nr. 440/2008 bør derfor ændres i overensstemmelse hermed.

(5) Foranstaltningerne i denne forordning er i overensstemmelse med udtalelse fra det udvalg, der er nedsat i henhold til artikel 133 i forordning (EF) nr. 1907/2006 —

---

[1] EUT L 396 af 30.12.2006, s. 1.

[2] Kommissionens forordning (EF) nr. 440/2008 af 30. maj 2008 om fastlæggelse af forsøgsmetoder i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets forordning (EF) nr. 1907/2006 om registrering, vurdering og godkendelse af samt begrænsninger for kemikalier (REACH) (EUT L 142 af 31.5.2008, s. 1).

[3] Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

VEDTAGET DENNE FORORDNING:

Artikel 1

Bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 ændres i overensstemmelse med bilaget til denne forordning.

Artikel 2

Denne forordning træder i kraft på tredjedagen efter offentliggørelsen i *Den Europæiske Unions Tidende*.

Denne forordning er bindende i alle enkeltheder og gælder umiddelbart i hver medlemsstat.

Udfærdiget i Bruxelles, den 15. juli 2014.

På Kommissionens vegne
José Manuel BARROSO
Formand

BILAG

I bilaget til forordning (EF) nr. 440/2008 foretages følgende ændringer:

Som kapitel B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 og B.58 tilføjes:

»B.53. **UNDERSØGELSE AF NEUROTOKSICITET UNDER UDVIKLINGEN**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 426 (2007). På et møde i København i juni 1995 drøftede en OECD-arbejdsgruppe om reproduktion og udviklingstoksicitet behovet for at ajourføre den eksisterende OECD-testvejledning for reproduktion og udviklingstoksicitet og for at udforme nye retningslinjer for de endepunkter, som endnu ikke er dækket (1). Arbejdsgruppen anbefalede, at der blev skrevet en testvejledning for udviklingsneurotoksicitet på grundlag af en vejledning fra den amerikanske miljøstyrelse (EPA-vejledning), som siden er blevet revideret (2). I juni 1996 blev der afholdt et andet møde i København for at hjælpe sekretariatet med at skitsere rammerne for en ny testvejledning vedrørende udviklingsneurotoksicitet, bl.a. de vigtigste elementer som f.eks. oplysninger om valg af dyrearter, doseringsperiode, testperiode, endepunkter, der skal vurderes, og kriterier for vurdering af resultater. Der blev udgivet en amerikansk vejledning i vurdering af neurotoksicitetsrisici i 1998 (3). Et OECD-konsultationsmøde med eksperter og en ILSI Risk Science Institute-workshop blev afholdt umiddelbart efter hinanden i oktober 2000, og i 2005 blev der afholdt et konsultationsmøde med eksperter i Tokyo. Disse møder blev holdt for at drøfte de videnskabelige og tekniske spørgsmål vedrørende den nuværende testvejledning, og der blev taget hensyn til anbefalingerne fra møderne (4)(5)(6)(7) i forbindelse med udviklingen af denne testmetode. Supplerende information om, hvilken adfærd, fortolkning og terminologi der skal anvendes til denne testmetode, kan ses i OECD's vejledning nr. 43 om reproduktiv toksicitetsundersøgelse og -vurdering (8) og nr. 20 om neurotoksicitetstest (9).

INDLEDENDE OVERVEJELSER

2. Det er kendt, at en række kemikalier forårsager en neurotoksisk påvirkning af udviklingen hos mennesker og andre arter (10)(11)(12)(13). En bestemmelse af potentialet for udviklingsneurotoksicitet kan være nødvendig for at vurdere og evaluere et kemikalies toksiske egenskaber. Udviklingsneurotoksicitetsundersøgelser skal resultere i data, bl.a. karakteriseringer af dosisrespons og om de potentielle funktionelle og morfologiske virkninger, der kan opstå på afkommets ikkefærdigudviklede nervesystem ved eksponering in utero og i den første levetid.

3. En udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse kan gennemføres som en særskilt undersøgelse, som en del af en reproduktionstoksicitetsundersøgelse og/eller en neurotoksicitetsundersøgelse af voksne (f.eks. testmetode B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) eller som tillæg til en prænatal udviklingstoksicitetsundersøgelse (f.eks. testmetode B.31 (17)). Når udviklingsneurotoksicitetsundersøgelsen indgår i eller knyttes til en anden undersøgelse, er det afgørende at bevare begge undersøgelsestypers integritet. Alle test skal overholde gældende lovgivning eller statslige og institutionelle retningslinjer for anvendelsen af forsøgsdyr i forskning (f.eks. 18).

4. Testlaboratoriet bør inden testens udførelse gennemgå alle tilgængelige oplysninger om testkemikaliet. Disse oplysninger skal omfatte kemikaliets identitet og struktur, dets fysisk-kemiske egenskaber, resultaterne af andre in vitro- eller in vivo-toksicitetstest af kemikaliet, toksikologiske data om strukturelt beslægtede stoffer, samt stoffets forventede anvendelse(r). Disse oplysninger er nødvendige for til alle parters tilfredshed at godtgøre, at testen har afgørende betydning for beskyttelsen af menneskers sundhed, og vil desuden være nyttige ved valg af passende startdosis.

PRINCIP FOR TESTEN

5. Testkemikaliet indgives til dyr under drægtighed og laktation. Moderdyr testes for at vurdere virkningerne hos drægtige og diegivende hunner og kan også give komparativ information (moderdyr kontra afkom). Afkom udvælges vilkårligt fra kuld med henblik på en vurdering af neurotoksiciteten. Vurderingen består af observationer for at afsløre større neurologiske og adfærdsmæssige abnormiteter, bl.a. vurdering af fysisk udvikling, adfærdsudvikling, motorisk aktivitet, motoriske og sensoriske funktioner samt indlæring og hukommelse og vurdering af hjernevægt og neuropatologi under postnatal udvikling og voksenliv.

6. Når testmetoden gennemføres som en særskilt undersøgelse, kan der anvendes yderligere tilgængelige dyr i hver gruppe til særlige neuroadfærdsmæssige, neuropatologiske, neurokemiske eller elektrofysiologiske procedurer, der kan supplere de data, der fås fra undersøgelser, som anbefales for denne testmetode (16)(19)(20)(21). De supplerende procedurer kan være særligt nyttige, når empiriske observationer, forventede virkninger eller virkningsmekanisme/virkemåde peger på neurotoksicitet af en bestemt art. Disse supplerende procedurer kan anvendes hos både moderdyr og unger. Endvidere kan ex vivo- eller in vitro-procedurer også følges, så længe disse procedurer ikke ændrer in vivo-procedurernes integritet.

FORBEREDELSER TIL TESTEN

Valg af dyreart

7. Den foretrukne dyreart er rotten, men andre arter kan bruges, når det er hensigtsmæssigt. Det skal dog bemærkes, at det antal drægtighedsdage og dage efter fødslen, der er anført i denne testmetode, gælder specifikt for de hyppigst anvendte rottestammer, og der bør vælges sammenlignelige dage, hvis der bruges en anden art eller en usædvanlig stamme. Anvendes der en anden art, skal dette begrundes med toksikologiske, farmakokinetiske og/eller andre data. I begrundelsen anføres, om der findes artsspecifikke postnatale neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske vurderinger. Hvis en tidligere test har givet anledning til bekymringer, bør den art/stamme, som blev anvendt, gennemgås. På grund af forskellige rottestammers forskellige ydeevneegenskaber skal der foreligge dokumentation for, at den valgte stamme har tilstrækkelig fertilitet og modtagelighed. Andre arters pålidelighed og følsomhed i forbindelse med detektion af udviklingsneurotoksicitet dokumenteres.

Miljøbetingelser og fodring

8. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 ± 3 °C. Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke. Det er også muligt at vende lyscyklussen forud for parring og i undersøgelsens løbetid for at foretage vurderinger af funktionelle og adfærdsmæssige endepunkter i mørke perioder (under rødt lys), dvs. i den tid dyrene er normalt aktive (22). Alle ændringer i lys-mørkecyklussen bør omfatte tilstrækkelig tid til akklimatisering, så dyrene kan tilpasse sig den nye cyklus. Der kan anvendes normalt laboratoriefoder med ubegrænset forsyning af drikkevand. Arten af foder og vand rapporteres, og begge dele analyseres for forurenende stoffer.

9. Dyrene kan anbringes individuelt eller i bure i små grupper af samme køn. Parring bør finde sted i bure, der er egnede til formålet. Efter tegn på kopulation eller senest på drægtighedsperiodens dag 15 anbringes parrede hunner hver for sig i fødebure eller yngelbure. Burene skal anbringes således, at mulige virkninger som følge af burenes placering minimeres. Parrede hunner skal forsynes med egnet og nærmere bestemt redemateriale, når fødselstidspunktet nærmer sig. Det er velkendt, at uhensigtsmæssig behandling eller stress i drægtighedsperioden kan medføre negative resultater, herunder prænatalt tab og forandringer i prænatal og postnatal udvikling. For at sikre mod prænatalt tab som følge af ikkebehandlingsrelaterede faktorer skal drægtige dyr håndteres med omhu, og stress forårsaget af ydre faktorer som støj skal undgås.

Forberedelse af dyrene

10. Der anvendes sunde dyr, som er tilvænnet laboratorieforholdene, og som ikke tidligere har været anvendt til eksperimenter, medmindre undersøgelsen indgår i en anden undersøgelse (se pkt. 3). Dyrene beskrives med hensyn til stamme, kilde, køn, vægt og alder. Hvert dyr tildeles og mærkes med sit eget identifikationsnummer. Dyrene i alle testgrupper skal så vidt muligt være af ensartet vægt og alder og skal ligge inden for normalområdet for den art eller stamme, der undersøges. På hvert dosisniveau anvendes unge voksne hundyr, som ikke tidligere har født. Det bør sikres, at søskendedyr ikke parres. Dag 0 i drægtighedsperioden (GD 0) er den dag, hvor der observeres en vaginal prop og/eller sperma. Der bør gives tilstrækkelig tid til akklimatisering (f.eks. 2-3 dage) ved køb af drægtige dyr fra en leverandør. Parrede hunner fordeles uden skævhed mellem kontrol- og behandlingsgrupperne og fordeles så vidt muligt ligeligt mellem grupperne (f.eks. anbefales en stratificeret vilkårlig procedure for at sikre en jævn fordeling mellem alle grupper f.eks. baseret på kropsvægt). Hunner, som insemineres af samme han, fordeles jævnt mellem grupperne.

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

11. I hver test- og kontrolgruppe skal der være et tilstrækkeligt antal drægtige hunner, som kan eksponeres for testkemikaliet, for at sikre, at der produceres et passende antal unger med henblik på vurdering af neurotoksiciteten. I alt 20 kuld anbefales på hvert dosisniveau. Doseringsdesign med gentagne eller forskudte grupper er tilladt, hvis det samlede antal kuld pr. gruppe opnås, og der anvendes passende statistiske modeller til forklaring af gentagelser.

12. På eller før dag 4 efter fødslen (PND 4) (dagen for fødslen er PND 0) skal størrelsen på hvert kuld tilpasses ved at fjerne ekstra unger ved vilkårlig udvælgelse for at få en ensartet kuldstørrelse for alle kuld (23). Kuldstørrelsen bør ikke overstige den gennemsnitlige kuldstørrelse for den anvendte stamme af gnavere (8-12). Kuldet skal så vidt muligt have lige mange han- og hununger. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt, er ikke hensigtsmæssigt. Efter standardiseringen af kuld (aflivning) og før den videre test af funktionelle endepunkter skal de enkelte unger, der skal testes før og efter fravænning, mærkes individuelt efter en egnet human metode til identificering af unger (f.eks. 24).

Fordeling af dyr til funktionelle og adfærdsmæssige test, hjernevejning og neuropatologiske vurderinger

13. Testmetoden giver mulighed for forskellige tilgange til fordeling af dyr eksponeret in utero og gennem laktation til funktionelle og adfærdsmæssige test, kønsmodning, bestemmelse af hjernevægt og neuropatologisk vurdering (25). Andre test af neuroadfærdsfunktion (f.eks. social adfærd), neurokemiske eller neuropatologiske undersøgelser kan tilføjes i det enkelte tilfælde, så længe integriteten af de oprindelige nødvendige test ikke skades.

14. Ungerne udvælges fra hver dosisgruppe og fordeles til endepunktsvurderinger på eller efter PND 4. Ungerne bør udvælges, således at begge køn fra hvert kuld i hver dosisgruppe så vidt muligt bliver ligeligt repræsenteret i alle test. Til test af motorisk aktivitet bør det samme par han- og hununger testes i alle aldersklasser før fravænning (se pkt. 35). Til alle andre test kan de samme eller særskilte par han- og hundyr fordeles til forskellige adfærdstest. Det kan være nødvendigt at fordele forskellige unger til kognitive funktionstest for fravænnede i modsætning til testen for voksne for at undgå, at disse målinger påvirkes af virkningerne af alder og forudgående træning (26)(27). Ved fravænning (PND 21) kan unger, der ikke udvælges til test, aflives humant. Evt. ændringer i fordelingerne af unger rapporteres. Den statistiske måleenhed er kuldet (eller moderdyret) og ikke ungen.

15. Der er forskellige måder at fordele unger på til eksperimenter før og efter fravænning, kognitive test, patologiske undersøgelser osv. (se figur 1 vedrørende generelt design og tillæg 1 for eksempler på fordeling). Det anbefalede minimumsantal dyr i hver dosisgruppe for undersøgelser før og efter fravænning er følgende:

Kliniske observationer og kropsvægt	Alle dyr
Detaljerede kliniske observationer	20/køn (1/køn/kuld)
Hjernevægt (efter fiksering) PND 11-22	10/køn (1/kuld)
Hjernevægt (ufikseret) ~ PND 70	10/køn (1/kuld)
Neuropatologi (immersions- eller perfusionsfiksering) PND 11-22	10/køn (1/kuld)
Neuropatologi (perfusionsfiksering) PND ~70	10/køn (1/kuld)

Kønsmodning	20/køn (1/køn/kuld)
Øvrige udviklingsmæssige kendetegn (valgfrit)	Alle dyr
Adfærdsudvikling	20/køn (1/køn/kuld)
Motorisk aktivitet	20/køn (1/køn/kuld)
Motorisk og sensorisk funktion	20/køn (1/køn/kuld)
Indlæring og hukommelse	10/køn [a] (1/kuld)

[a] Afhængigt af de kognitive funktionstests følsomhed bør det overvejes at undersøge et større antal dyr, f.eks. op til én han og én hun pr. kuld (se tillæg 1 vedrørende fordeling af dyr) (OECD's vejledning 43 (8) indeholder yderligere vejledning om prøvestørrelse).

Dosering

16. Der anvendes mindst tre dosisstørrelser og en sideløbende kontrol. Dosisstørrelserne vælges med sådanne intervaller, at der opnås en gradueret toksisk effekt. Medmindre kemikaliets fysisk-kemiske eller biologiske egenskaber sætter grænser for doseringen, vælges det højeste doseringsniveau således, at det har en vis toksisk effekt på moderdyret (f.eks. kliniske tegn, vægttab (højst 10 %) og/eller evidens for en dosisbegrænsende toksicitet i et målorgan). Den høje dosis kan begrænses til 1 000 mg/kg/dag kropsvægt med visse undtagelser. F.eks. kan den forventede humane eksponering foranledige, at der benyttes en højere dosis. Alternativt foretages pilotundersøgelser eller foreløbige »range-finding«-undersøgelser for at bestemme de højeste doser, der skal anvendes for at give en minimal grad af toksicitet hos moderdyret. Hvis testkemikaliet har vist sig at være udviklingstoksisk enten i en standardudviklingstoksicitetsundersøgelse eller i en pilotundersøgelse, bør den højeste dosisstørrelse være den maksimale dosis, der ikke påfører for stærk toksicitet hos afkommet eller in utero- eller neonatal død eller deformationer, der er tilstrækkeligt alvorlige til at udelukke en meningsfuld vurdering af neurotoksiciteten. Den laveste dosering må hverken medføre tegn på maternel toksicitet eller udviklingstoksicitet, herunder neurotoksicitet. Der vælges faldende dosisstørrelse med henblik på at påvise en evt. dosisrelateret respons, og det niveau, som ikke medfører observeret skadelig virkning (NOAEL), eller doser nær detektionsgrænsen, således at der kan bestemmes en benchmarkdosis. For at fastlægge den aftagende række dosisstørrelser svarer de optimale intervaller ofte til en faktor to til fire, og i mange tilfælde må tilføjelse af en fjerde behandlingsgruppe ofte foretrækkes frem for meget store intervaller (f.eks. større end en faktor 10) mellem dosisstørrelserne.

17. Doseringen vælges under hensyntagen til alle foreliggende toksicitetsdata samt supplerende oplysninger om metabolisme og toksikokinetik af testkemikalie eller beslægtede stoffer. Sådanne oplysninger kan desuden være med til at godtgøre, at den valgte dosering er hensigtsmæssig. Direkte dosering til unger bør overvejes på grundlag af eksponering og farmakokinetiske oplysninger (28)(29). Fordele og ulemper overvejes omhyggeligt, før der foretages direkte doseringsundersøgelser (30).

18. Den sideløbende kontrolgruppe skal være ubehandlet eller behandles med vehikel, hvis et sådant anvendes til indgift af testkemikaliet. Alle dyr skal normalt have samme mængde af enten testkemikalie eller vehikel på grundlag af kropsvægt. Anvendes et vehikel eller andet tilsætningsstof for at lette doseringen, tages følgende egenskaber i betragtning: indvirkningen på testkemikaliets absorption, distribution, metabolisme og retention af testkemikaliet; evt. indvirkning på testkemikaliets kemiske egenskaber, som kan ændre dets toksiske egenskaber, samt indvirkningen på dyrenes foder- og vandindtagelse eller ernæringstilstand. Vehiklet må ikke skabe virkninger, der vanskeliggør fortolkningen af undersøgelsen, og det må heller ikke være neuroadfærdsmæssigt toksisk eller påvirke reproduktion eller udvikling. For nye vehikler skal der inkluderes en ubehandlet kontrolgruppe ud over vehikelkontrolgruppen. Dyrene i kontrolgruppen/-grupperne behandles nøjagtigt som dyrene i testgruppen/-grupperne.

Indgift af doser

19. Testkemikalie eller vehikel indgives ad den vej, som er mest relevant i forhold til human eksponering, og på grundlag af de foreliggende oplysninger om metabolisme og fordeling i forsøgsdyrene. Indgiftsvejen er normalt oral (f.eks. gennem sonde, i føden eller i drikkevandet), men andre veje (f.eks. gennem huden eller ved inhalation) kan benyttes alt efter kendetegn og forventede eller kendte eksponeringsveje for mennesker (OECD's vejledning 43 (8) indeholder yderligere oplysninger). Den valgte indgiftsvej skal begrundes. Testkemikaliet indgives på omtrent samme tidspunkt hver dag.

20. Dosis til det enkelte dyr baseres normalt på den seneste bestemmelse af dyrets kropsvægt. I den sidste tredjedel af drægtighedsperioden må justering af doseringen dog ske med varsomhed. Konstateres der kraftig toksisk effekt hos de behandlede moderdyr, skal disse aflives på en human måde.

21. Testkemikaliet eller -vehiklet indgives som minimum dagligt til parrede hunner fra implantationstidspunktet (GD 6) og i hele laktationsperioden (PND 21), så ungerne eksponeres for testkemikaliet under den præ- og postnatale neurologiske udvikling. Den alder, hvor doseringen starter, og doseringens varighed og frekvens kan justeres, hvis der er dokumentation for et forsøgsdesign, som er mere relevant i forhold til menneskers eksponering. Doseringsvarigheden justeres til andre arter for at sikre eksponering i alle tidlige perioder af hjerneudviklingen (dvs. svarende til prænatal og tidlig postnatal hjernevækst hos mennesker). Dosering kan begynde fra drægtighedsperiodens begyndelse (GD 0), om end man skal være opmærksom på risikoen for, at testkemikaliet forårsager letal virkning før implantation. Ved at indgive kemikaliet på GD 6 kan denne risiko undgås, men udviklingsstadierne mellem GD 0 og 6 vil så ikke blive behandlet. Køber et laboratorium tidsparrede dyr, er det upraktisk at begynde doseringen på GD 0, og i så fald vil GD 6 være en god begyndelsesdag. Testlaboratoriet fastsætter doseringen efter relevant information om testkemikaliets virkninger, tidligere erfaringer og logistiske hensyn. Dette kan betyde, at doseringen udvides ud over fravænningen. Dosering bør ikke forekomme på dagen for fødslen, hvis dyret ikke er helt færdig med at føde sit afkom. Normalt antages det, at ungernes eksponering sker gennem modermælken. Dog bør direkte dosering af unger overvejes i tilfælde, hvor der ikke er tegn på, at ungerne eksponeres kontinuerligt. Tegn på kontinuerlig eksponering kan hentes fra f.eks. farmakokinetiske oplysninger, toksicitet hos afkommet eller ændringer i biomarkører (28).

OBSERVATIONER

Observationer på moderdyr

22. Alle moderdyr observeres nøje mindst én gang dagligt med hensyn til deres almindelige helbredstilstand, herunder morbiditet og mortalitet

23. I behandlings- og observationsperioder foretages detaljerede kliniske observationer jævnligt (mindst to gange ved dosering i drægtighedsperioden og to gange ved dosering i laktationsperioden), idet der anvendes mindst 10 moderdyr pr. dosisniveau. Dyrene observeres uden for deres eget bur af uddannede teknikere, der ikke kender til dyrenes behandling, og efter standardiserede procedurer for at minimere dyrenes stress og forudindtagethed hos observatøren og maksimere pålideligheden mellem observatører. Hvor det er muligt, anbefales det, at observationerne i en given undersøgelse foretages af den samme tekniker.

24. Tilstedeværelsen af observerede tegn registreres. Også størrelsesordenen af de observerede tegn registreres, når det er muligt. De kliniske observationer omfatter, men er ikke begrænset til, ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster og/eller mundrespiration og evt. symptomer vedrørende vandladning eller defækation).

25. Evt. usædvanlig respons med hensyn til kropsstilling, aktivitetsniveau (f.eks. nedsat eller øget udforskning af »open field«) og koordinering af bevægelser registreres ligeledes. Ændringer i gangen (f.eks. vralten, ataksi), kropsstilling (f.eks. pukkelrygget) og reaktion på håndtering samt optræden af kloniske eller toniske bevægelser, kramper eller tremor, stereotypier (f.eks. overdreven pleje af pels, usædvanlige bevægelser med hovedet, gentagne cirkelbevægelser) eller bizar adfærd (bidning eller overdreven slikning, selvmutilering, baglæns gang, vokalisation) eller aggression protokolleres.

26. Alle tegn på toksicitet registreres, herunder dato og klokkeslæt for indtræden af unormal adfærd samt grad og varighed.

27. Dyrene vejes på doseringstidspunktet mindst én gang om ugen under hele undersøgelsen, på eller tæt på fødselstidspunktet og på PND 21 (fravænning). I forsøg med indgift gennem sonde vejes moderdyr mindst to gange om ugen. Doser justeres på tidspunktet for bestemmelse af hver kropsvægt, som det er hensigtsmæssigt. Fødeindtagelse måles én gang om ugen som minimum under drægtighed og laktation. Vandindtagelse måles mindst én gang om ugen, hvis eksponering sker gennem vandforsyningen.

Observationer af afkom

28. Alt afkom observeres nøje mindst én gang dagligt for tegn på toksicitet samt for morbiditet og mortalitet.

29. I behandlings- og observationsperioder foretages mere detaljerede kliniske observationer af afkommet. Afkommet (mindst én unge/køn/kuld) observeres af uddannede teknikere, der ikke kender til dyrenes behandling, og efter standardiserede procedurer for at minimere forudindtagethed hos observatøren og maksimere pålideligheden mellem observatører. Hvor det er muligt, anbefales det, at observationerne foretages af den samme tekniker. Som minimum overvåges endepunkterne, jf. pkt. 24 og 25, med hensyn til det udviklingstrin, som observeres, hvis det er relevant.

30. Alle tegn på toksicitet hos afkommet registreres, herunder dato og klokkeslæt for indtræden af unormal adfærd samt grad og varighed.

Fysiske og udviklingsmæssige kendetegn

31. Ændringer i udviklingskendetegn før fravænningen (f.eks. åbning af ydre ører og øjne, frembrud af fortand) hænger tæt sammen med kropsvægt (30)(31). Kropsvægt kan være den bedste indikator for fysisk udvikling. Måling af udviklingsmæssige kendetegn anbefales derfor kun, når der på forhånd er tegn på, at disse endepunkter vil give ekstra oplysninger. Tidspunkter for vurdering af disse parametre er anført i tabel 1. Alt efter de forventede virkninger og resultaterne af de indledende målinger kan det være tilrådeligt at tilføje ekstra tidspunkter eller foretage målingerne på andre udviklingstrin.

32. Det anbefales at benytte postkoital alder i stedet for postnatal alder ved vurdering af fysisk udvikling (33). Hvis unger testes på fravænningsdagen, anbefales det, at denne test udføres før den faktiske fravænning for at undgå en forvirrende effekt fremkaldt af stress i forbindelse med fravænningen. Endvidere bør test af unger efter fravænning ikke ske i de første to dage efter fravænningen.

Tabel 1

Tidsplan for vurdering af fysiske og udviklingsmæssige kendetegn samt funktionelle/adfærdsmæssige endepunkter [a]

Aldersperioder / Endepunkter	Før fravænning [b]	Unge [b]	Unge voksne [b]
Fysiske og udviklingsmæssige kendetegn			
Kropsvægt og kliniske observationer	én gang om ugen [c]	mindst hver anden uge	mindst hver anden uge
Hjernevægt	PND 22 [d]		ved afslutning
Neuropatologi	PND 22 [d]		ved afslutning
Kønsmodning	—	hvis det er relevant	—
Øvrige udviklingsmæssige kendetegn [e]	hvis det er relevant	—	—

Endepunkter \ Aldersperioder	Før fravænning [b]	Unge [b]	Unge voksne [b]
Funktionelle/adfærdsmæssige kendetegn			
Adfærdsudvikling	Mindst to målinger		
Motorisk aktivitet (herunder tilvænning)	1-3 gange [f]	—	én gang
Motorisk og sensorisk funktion	—	én gang	én gang
Indlæring og hukommelse	—	én gang	én gang

[a] Denne tabel viser, hvor mange gange der som minimum skal foretages målinger. Alt efter de forventede virkninger og resultaterne af de indledende målinger kan det være tilrådeligt at tilføje ekstra tidspunkter (f.eks. ældre dyr) eller foretage målingerne på andre udviklingstrin.
[b] Det anbefales, at unger ikke testes de første to dage efter fravænningen (se pkt. 32). Anbefalet alder for test af unge er: indlæring og hukommelse = PND 25 ± 2, motorisk og sensorisk funktion = PND 25 ± 2. Anbefalet alder for test af unge voksne er PND 60-70.
[c] Kropsvægt måles mindst to gange om ugen ved direkte dosering af unger med henblik på justering af doser på et tidspunkt med hurtig forøgelse af kropsvægten.
[d] Hjernevægt og neuropatologi kan evt. vurderes på et tidligere tidspunkt (f.eks. PND 11) (se pkt. 39).
[e] Andre udviklingsmæssige kendetegn ud over kropsvægt (f.eks. åbning af øjne) registreres, når det er relevant (se pkt. 31).
[f] Se pkt. 35.

33. Levende unger tælles og kønsbestemmes, f.eks. ved visuel kontrol eller måling af den anogenitale afstand (34)(35), og hver unge i et kuld vejes individuelt ved fødslen eller snarest efter, mindst én gang om ugen under laktation og herefter mindst én gang hver anden uge. Når kønsmodningen er vurderet, bestemmes dyrets alder og kropsvægt på tidspunktet for åbning af vagina (36) og separation af præputium (37) for mindst én han og en hun pr. kuld.

Adfærdsudvikling

34. Udvikling af udvalgte adfærdsformer måles hos mindst én unge/køn/kuld i den relevante aldersperiode, idet de samme unger anvendes på alle testdage til alle vurderede adfærdsformer. Målingsdagene fordeles jævnt over perioden for at definere enten den normale eller behandlingsrelaterede ændring i udviklingen af den pågældende adfærd (38). Følgende er eksempler på adfærdsformer, hvis ontogenese kan vurderes: opretningsrefleks, negativ geotaxis og motorisk aktivitet (38)(39)(40).

Motorisk aktivitet

35. Motorisk aktivitet overvåges (41)(42)(43)(44)(45) inden fravænningen og i den voksne periode. Med hensyn til test på fravænningstidspunktet henvises til pkt. 32. Testsessionen skal være lang nok til at påvise ubehandlede kontroldyrs tilvænning i løbet af sessionen. Anvendelse af motorisk aktivitet til at vurdere individets adfærdsudvikling anbefales kraftigt. Hvis testen bruges som en test af adfærdsudvikling, anvendes de samme dyr til alle testsessioner før afvænning. Testen skal ske tilstrækkeligt hyppigt til at vurdere udviklingen i tilvænningen i løbet af sessionen (44). Dette kan kræve tre eller flere tidsperioder forud for og inklusive fravænningsdagen (f.eks. PND 13, 17, 21). Test af de samme dyr eller dyr fra samme kuld skal også ske i voksenalderen, tæt på undersøgelsens afslutning (f.eks. PND 60-70). Der kan om nødvendigt foretages test på supplerende dage. Motorisk aktivitet overvåges af et automatisk aktivitetsregistrerende apparat, som skal kunne afsløre både stigninger og fald i aktiviteten (dvs. at referenceaktiviteten som målt af apparatet ikke må være så lav, at fald ikke afsløres, og heller ikke så høj, at aktivitetsstigninger ikke registreres). Hvert apparat testes efter standardprocedurer for så vidt muligt at sikre operationens pålidelighed på tværs af apparater og dage. Så vidt muligt skal behandlingsgrupperne være ligeligt fordelt på tværs af apparaterne. Hvert dyr testes individuelt. Behandlingsgrupper udlignes på tværs af testgange for at

undgå sammenblanding af cirkadiske aktivitetsrytmer. Man skal bestræbe sig på at sikre, at variationer i testbetingelserne er minimale og ikke systematisk relateres til behandlingen. Blandt de variabler, der kan påvirke mange adfærdsmålinger, bl.a. motorisk aktivitet, er lydniveau, testburets størrelse og form, temperatur, relativ luftfugtighed, lysforhold, lugte, brug af eget bur eller nyt testbur og forstyrrelser fra omgivelserne.

Motorisk og sensorisk funktion

36. Motorisk og sensorisk funktion undersøges i detaljer mindst én gang for modningsperioden og én gang i den unge voksenperiode (f.eks. PND 60-70). Med hensyn til test på fravænningstidspunktet henvises til pkt. 32. Der skal foretages tilstrækkeligt mange forsøg til at sikre en passende kvantitativ prøvetagning af sensoriske modaliteter (f.eks. somatosensoriske, vestibulære) og motoriske funktioner (f.eks. styrke, koordination). Nogle få eksempler på test for motorisk og sensorisk funktion er træk/tryk-respons (46), opretningsrefleks (47)(48), auditiv startle tilvænning (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) og evokerede potentialer (55).

Indlærings- og hukommelsesforsøg

37. En associativ indlærings- og hukommelsestest gennemføres efter fravænning (f.eks. 25 ± 2 dage) og for unge voksne (PND 60 og derover). Med hensyn til forsøg på fravænningstidspunktet henvises til pkt. 32. Den samme eller (en) særskilt(e) test kan benyttes på disse to udviklingstrin. Der er mulighed for en vis fleksibilitet i valget af test for indlæring og hukommelse hos fravænnede og voksne rotter. Testen/-ene designes dog således, at de opfylder to kriterier. For det første vurderes indlæringen enten som en ændring på tværs af flere gentagne indlæringstest eller -sessioner eller i test, der omfatter et enkelt forsøg, med henvisning til en betingelse, som sikrer kontrol med ikkeassociative virkninger af træningseksperimentet. For det andet skal testen/-ene omfatte en vis måling af hukommelsen (kort- eller langtids-) ud over oprindelig indlæring (færdighed), men denne hukommelsesmåling kan ikke rapporteres, da der mangler en færdighedsmåling, der fås fra samme test. Hvis indlærings- og hukommelsestesten/-ene viser en virkning af testkemikaliet, kan det overvejes at foretage supplerende test for at udelukke alternative fortolkninger baseret på ændringer i sensorisk, motivationsmæssig og/eller motorisk kapacitet. Ud over ovenstående to kriterier anbefales det, at indlærings- og hukommelsestesten vælges på grundlag af sin påviste følsomhed over for den undersøgte kemikalieklasse, hvis disse oplysninger er tilgængelige i litteraturen. I mangel af sådanne oplysninger omfatter eksempler på test, der kan foretages for at opfylde ovenstående kriterier: passiv undgåelse (43)(56)(57), delayed-matching-to-position for den voksne rotte (58) og for den spæde rotte (59), olfaktorisk konditionering (43)(60), Morris' vandlabyrint (61)(62)(63), Biel- eller Cincinnati-labyrinten (64)(65), radialarmslabyrint (66), T-labyrint (43) og tilegnelse og fastholdelse af »schedule-controlled« adfærd (26)(67)(68). Supplerende test beskrives i litteraturen for fravænnede (26)(27) og voksne rotter (19)(20).

Obduktion

38. Moderdyr kan aflives efter fravænning af afkommet.

39. Den neuropatologiske vurdering af afkommet sker ved hjælp af væv fra dyr, der er aflivet på en human måde på PND 22 eller på et tidligere tidspunkt mellem PND 11 og PND 22 samt ved testens afslutning. For afkom aflivet efter PND 22 vurderes hjernevæv. For dyr aflivet ved testens afslutning vurderes væv fra både centralnervesystemet (CNS) og det perifere nervesystem (PNS). Dyr aflivet på PND 22 eller tidligere kan fikseres ved enten immersion eller perfusion. Dyr aflivet ved testens afslutning fikseres ved perfusion. I forbindelse med alle aspekter af præpareringen af vævsprøver, fra perfusion af dyrene over dissektion af vævsprøver, vævsbehandling og farvning på objektglas følges et afbalanceret design, således at hver batch indeholder repræsentative prøver fra hver dosisgruppe. OECD's vejledning nr. 20 (9) indeholder supplerende vejledning om neuropatologiske undersøgelser. Se endvidere (103).

Behandling af vævsprøver

40. Alle større abnormiteter, der er synlige på obduktionstidspunktet noteres. Udtagne vævsprøver skal repræsentere alle større dele af nervesystemet. Vævsprøverne præserveres i et egnet fiksativ og behandles ifølge standardiserede offentliggjorte histologiske protokoller (69)(70)(71) (103). Paraffinfiksering er acceptabelt for væv fra CNS og PNS, men osmium ved postfiksering sammen med epoxyfiksering kan være hensigtsmæssigt, når der kræves en højere adskillelsesgrad (f.eks. for perifere nerver ved mistanke om perifer neuropati og/eller til morfometrisk

analyse af perifere nerver). Hjernevæv udtaget til morfometrisk analyse fikseres i egnede medier ved alle dosisniveauer samtidig for at undgå skrumpning, der kan optræde i forbindelse med langvarig opbevaring i fiksativ (6).

Neuropatologisk undersøgelse

41. Formålet med den kvalitative undersøgelse er:

i) at identificere områder i nervesystemet, der viser tegn på neuropatologiske forandringer

ii) at identificere typer af neuropatologiske forandringer, der følger af eksponering for testkemikaliet

iii) at bestemme de neuropatologiske forandringers sværhedsgrader.

Repræsentative histologiske snit af vævsprøver undersøges i mikroskop af en uddannet patolog for tegn på neuropatologiske forandringer. Alle neuropatologiske forandringer tildeles en subjektiv sværhedsgrad. En hematoxylin-eosin-farvning kan være tilstrækkelig til at vurdere hjernesnit af dyr, der er aflivet humant på PND 22 eller tidligere. En myelinfarvning (f.eks. luxol fast blue/cresyl violet) og en sølvfarvning (f.eks. Bielschowskys eller Bodians farvestoffer) anbefales til snit af CNS- og PNS-væv fra dyr aflivet ved testens afslutning. Med forbehold for patologens faglige vurdering og typen af observerede forandringer kan andre farver findes egnede til at identificere og karakterisere særlige typer af forandringer (f.eks. gliafibrillært surt protein (GFAP) eller lektin histokemi til at vurdere glia- og mikrogliaforandringer (72), fluoro-jade til at afsløre nekrose (73)(74) eller sølvfarve specifikt til neural degeneration (75)).

42. En morfometrisk (kvantitativ) vurdering udføres, da disse data kan bidrage til at detektere en behandlingsrelateret virkning og er værdifulde i fortolkningen af behandlingsrelaterede forskelle i hjernevægt eller morfologi (76)(77). Nervevæv udtages og præpareres med henblik på morfometrisk vurdering. Morfometriske vurderinger kan omfatte f.eks. lineære målinger eller arealmålinger af særlige hjerneområder (78). Lineære målinger eller arealmålinger kræver brug af homologe snit, der er omhyggeligt udvalgt på grundlag af pålidelige mikroskopiske kendetegn (6). Stereologi kan anvendes til at identificere behandlingsrelaterede virkninger på parametre såsom volumen eller celleantal til bestemte neuroanatomiske områder (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Hjernerne undersøges for evt. tegn på behandlingsrelaterede neuropatologiske forandringer, og der udtages passende prøver fra alle større dele af hjernen (f.eks. bulbus olfactorius, cortex cerebralis, hippocampus, basalganglier, thalamus, hypothalamus, midterhjernen (tectum, tegmentum og pedunculus cerebri), pons, medulla oblongata, cerebellum) for at sikre en grundig undersøgelse. Det er vigtigt, at snit for alle dyr tages i samme plan. Hos voksne, der er humant aflivet ved undersøgelsens afslutning, udtages repræsentative snitprøver af rygmarven og PNS. De undersøgte områder skal omfatte øjet med nervus opticus og retina, rygmarven med intumescentia cervicalis og lumbalis, fibre fra de dorsale og ventrale rødder, den proksimale del af nervus sciaticus, den proksimale del af nervus tibialis (ved knæet) og lægmuskelgrenene af nervus tibialis. Der skal være både tværsnit og længdesnit af rygmarv og perifere nerver.

44. Den neuropatologiske evaluering skal omfatte en undersøgelse for tegn på udviklingsskader på nervesystemet (6)(85)(86)(87)(88)(89) ud over celleforandringer (f.eks. neuronal vakuolation, degeneration, nekrose) og vævsforandringer (f.eks. gliosis, leukocytinfiltration, cystedannelse). I den forbindelse er det vigtigt at skelne behandlingsrelaterede virkninger fra normale udviklingshændelser, som man ved, opstår på et udviklingstrin svarende til aflivningstidspunktet (90). Eksempler på væsentlige forandringer, der peger på udviklingsskade, omfatter, men er ikke begrænset til:

— forandringer i den makroskopisk synlige størrelse eller form af bulbus olfactorius, cerebrum eller cerebellum

— forandringer i forskellige hjerneområders relative størrelse, bl.a. fald eller stigninger i områdestørrelse som følge af tab eller persistens af normalt transiente cellepopulationer eller axonale projektioner (f.eks. eksternt germinallag på cerebellum, corpus callosum)

— forandringer i proliferation, migration og differentiation, som viser sig ved områder med stærk apoptose eller nekrose, klynger eller spredte populationer af ektopiske, desorienterede eller misdannede neuroner eller forandringer i forskellige cortikale strukturlags relative størrelse

— forandringer i myeliniseringsmønstre, herunder en samlet størrelsesreduktion eller ændret farvning af myelinerede strukturer

— tegn på hydrocephalus, især udvidelse af ventrikler, stenosis af aqueductus cerebri og tyndere cerebralhemisfærer.

Analyse af neuropatologiske forandringers dosis-responssammenhæng

45. Følgende trinvise procedure anbefales til kvalitative og kvantitative neuropatologiske analyser. Først sammenlignes snit fra højdosisgrupper med snit fra kontrolgruppen. Hvis der ikke findes tegn på neuropatologiske forandringer i dyrene fra højdosisgruppen, kræves der ingen yderligere analyse. Findes der tegn på neuropatologiske forandringer i højdosisgruppen, undersøges dyr fra mellem- og lavdosisgrupperne. Hvis højdosisgruppen afsluttes på grund af død eller anden konfunderet toksicitet, analyseres høj- og mellemdosisgrupperne for neuropatologiske forandringer. Er der tegn på neurotoksicitet i lavere dosisgrupper, udføres en neuropatologisk analyse i de pågældende grupper. Såfremt der findes behandlingsrelaterede neuropatologiske forandringer ved den kvalitative og kvantitative undersøgelse, bestemmes dosisafhængigheden for forekomst, frekvens og læsionernes eller de morfometriske forandringers sværhedsgrad på grundlag af en vurdering af alle dyr fra alle dosisgrupper. Alle hjerneområder, der udviser tegn på neuropatologisk forandring medtages i denne vurdering. For hver læsionstype beskrives de kendetegn, som anvendes til at definere hver sværhedsgrad, med angivelse af de symptomer, der er benyttet til at differentiere hver grad. Frekvensen af hver læsionstype og sværhedsgraden heraf registreres, og der udføres en statistisk analyse for at evaluere arten af en dosis-responssammenhæng. Det anbefales at anvende kodede objektglas (91).

DATA OG RAPPORTERING

Data

46. Data rapporteres individuelt og opsummeres i tabelform, der for hver testgruppe viser typer af forandringer og antal moderdyr, afkom efter køn samt kuld og med angivelse af hver type forandring. Er der foretaget direkte postnatal eksponering af afkom, rapporteres eksponeringsvej, -varighed og -periode.

Evaluering og fortolkning af resultater

47. En udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse skal indeholde oplysninger om virkningerne af gentagen eksponering for et kemikalie i in utero- og den tidlige postnatale udvikling. Da vægten ligger på endepunkter for både generel toksicitet og udviklingsneurotoksicitet, vil resultaterne af undersøgelsen gøre det muligt at skelne mellem neuroudviklingsmæssige virkninger, som opstår uden generel maternel toksicitet, og dem, der kun kommer til udtryk på niveauer, som også er toksiske for moderdyret. På grund af det komplekse samspil mellem undersøgelsesdesign, statistisk analyse og dataenes biologiske signifikans, kræver en adækvat fortolkning af udviklingsneurotoksicitetsdata en ekspertvurdering (107)(109). Ved fortolkning af testresultater følges en »weight-of-evidence«-tilgang (20)(92)(93)(94). Evt. mønstre i adfærdsmæssige eller morfologiske resultater samt tegn på dosisrespons diskuteres. Data fra alle undersøgelser af relevans for evalueringen af udviklingsneurotoksicitet, bl.a. humanepidemiologiske undersøgelser eller caserapporter og eksperimentelle dyreunderstudier (f.eks. toksikokinetiske data, oplysninger om struktur/aktivitet, data fra andre toksicitetsundersøgelser) medtages i denne karakterisering. Dette omfatter forholdet mellem doser af testkemikaliet og tilstedeværelse eller mangel, incidens og omfang af en evt. neurotoksisk virkning for hvert køn (20)(95).

48. Evalueringen af data skal indeholde en diskussion af både biologisk og statistisk signifikans. Statistisk analyse skal ses som et værktøj, der guider snarere end bestemmer fortolkningen af data. Manglende statistisk signifikans må ikke være det eneste rationale for at konkludere, at der mangler en behandlingsrelateret virkning, ligesom statistisk signifikans ikke må være den eneste begrundelse for at konkludere, at der foreligger en behandlingsrelateret virkning. For at sikre mod mulige falsk negative fund og de iboende vanskeligheder med at »bevise et negativt fund« skal tilgængelige positive og tidligere kontroldata diskuteres, især når der ikke er nogen behandlingsrelaterede virkninger (102)(106). Sandsynligheden for falsk positive fund diskuteres i lyset af den samlede statistiske evaluering af dataene (96). Evalueringen skal indeholde en evt. sammenhæng mellem observerede neuropatologiske og adfærdsmæssige forandringer.

49. Alle resultater analyseres ved hjælp af statistiske modeller, som egner sig til testens design (108). Valget af en parametrisk eller ikkeparametrisk analyse begrundes ved inddragelse af faktorer såsom dataenes art (transformerede eller ej) og fordelingen heraf samt den valgte statistiske analyses relative robusthed. Undersøgelsens formål og design skal være styrende for valget af statistiske analyser for at minimere type I-fejl (falsk positive) og type II-fejl (falsk negative) (96)(97)(104)(105). Udviklingsundersøgelser med arter, som føder flere unger på én gang, og hvor der testes mange unger pr. kuld, skal inkludere kuldet i den statistiske model for at sikre mod en oppustet type I-fejlhyppighed (98)(99)(100)(101). Den statistiske måleenhed er kuldet og ikke ungen. Forsøgene designes, så dyr fra samme kuld ikke behandles som uafhængige observationer. Et evt. endepunkt, som gentagne gange måles hos det samme individ, analyseres under anvendelse af statistiske modeller, der tager højde for, at målingerne ikke er uafhængige.

Testrapport

50. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikaliet

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— identifikationsdata, herunder kilde

— præparatets renhed og kendte og/eller forventede urenheder

Evt. vehikel

— begrundelse for valg af vehikel, hvis dette ikke er vand eller fysiologisk saltvand.

Forsøgsdyr

— den anvendte art og stamme samt begrundelse for anvendelse af andet end rotter

— leverandør af forsøgsdyr

— antal dyr samt deres køn og alder ved testens begyndelse

— oprindelse, miljøbetingelser, kost, vand osv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse.

Testbetingelser

— rationale for valg af dosisniveau

— rationale for doseringsvej og tidsperiode

— specifikationer af indgivne doser, herunder oplysninger om vehikel og det indgivne stofs volumen og fysiske form

— oplysninger om formuleringen af testkemikalie/fodertilberedning, opnået koncentration, tilberedningens stabilitet og homogenitet

— anvendt metode til entydig identifikation af moderdyr og afkom

— en detaljeret beskrivelse af de(n) randomiseringsprocedure(r), der er fulgt ved fordeling af moderdyr på behandlingsgrupper, udvælgelse af unger til aflivning og fordeling af unger til testgrupper

— oplysninger om indgift af testkemikaliet

— evt. omregning fra testkemikaliekoncentration (ppm) i foder/drikkevand eller inhalation til opnået dosis (mg/kg kropsvægt/dag)

— miljøbetingelser

— oplysninger om kvaliteten af foder og vand (f.eks. fra vandhanen, destilleret)

— datoer for undersøgelsens begyndelse og afslutning.

Observationer og testprocedurer

— en detaljeret beskrivelse af procedurer anvendt til at standardisere observationer og procedurer samt operationelle definitioner for bedømmelse af observationer

— en liste over alle anvendte testprocedurer og begrundelse for anvendelsen heraf

— oplysninger om de anvendte adfærdsmæssige/funktionelle, patologiske, neurokemiske eller elektrofysiologiske procedurer, herunder oplysninger og detaljer om automatiserede anordninger

— procedurer til kalibrering og sikring af anordningernes ækvivalens og afbalancering af behandlingsgrupper i testprocedurer

— en kort begrundelse for evt. beslutninger baseret på faglig vurdering.

Resultater (individuelle og resumé, herunder middeltal og varians, når det er relevant)

— antal dyr ved undersøgelsens begyndelse og antal ved undersøgelsens afslutning

— antal dyr og kuld anvendt til hver testmetode

— identifikationsnummer for hvert dyr og hvert kuld, det kom fra

— kuldstørrelse og gennemsnitsvægt ved fødslen fordelt på køn

— data om kropsvægt og kropsvægtændringer, herunder slutvægt, for moderdyr og afkom

— evt. data om føde- og vandindtagelse (f.eks. hvis testkemikaliet indgives i vand)

— data for toksiske reaktioner efter køn og dosisniveau, herunder tegn på toksicitet eller mortalitet, bl.a. evt. tidspunkt og dødsårsag

— de detaljerede kliniske observationers art, grad, varighed, startdato og klokkeslæt samt efterfølgende forløb

— scoreværdi for hvert udviklingskendetegn (vægt, kønsmodning og adfærdsudvikling) på hvert observationstidspunkt

— en detaljeret beskrivelse af alle adfærdsmæssige, funktionelle, neuropatologiske, neurokemiske og elektrofysiologiske fund efter køn, herunder både stigninger og fald i forhold til kontrolgrupper

— obduktionsfund

— hjernevægt

— evt. diagnoser udledt af neurologiske tegn og læsioner, herunder naturligt forekommende sygdomme eller tilstande

— billeder af eksemplariske fund

— »low-power«-billeder til at vurdere homologien af snit anvendt til morfometri

— data om absorption and metabolisme, herunder evt. supplerende data fra en separat toksikokinetisk undersøgelse

— statistisk behandling af resultater, herunder statistiske modeller anvendt til analyse af data og resultater, uanset om de var signifikante eller ej

— liste over forsøgsmedarbejdere, bl.a. uddannelse.

Diskussion af resultater

— oplysninger om dosisrespons fordelt på køn og gruppe

— evt. andre toksiske virkningers sammenhæng med en konklusion vedrørende testkemikaliets neurotoksiske potentiale fordelt på køn og gruppe

— evt. toksikokinetiske oplysningers indvirkninger på konklusionerne

— virkningernes ligheder med kendte neurotoksiske stoffer

— data, der støtter testmetodens pålidelighed og følsomhed (dvs. positive og tidligere kontroldata)

— evt. sammenhæng mellem neuropatologiske og funktionelle virkninger

— NOAEL eller benchmarkdosis for moderdyr og afkom fordelt på køn og gruppe.

Konklusioner

— en diskussion af den samlede fortolkning af data baseret på resultater, herunder en konklusion om, hvorvidt testkemikaliet forårsagede udviklingsneurotoksicitet og NOAEL.

LITTERATUR

1) OECD (1995). Draft Report of the OECD Ad Hoc Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. København, Danmark, 13.-14. juni 1995.

2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Tilgængelig på: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Tilgængelig på: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001) Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., USA, 23.-25. oktober 2000.

8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris, juli 2008. Tilgængelig på: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage = en].

9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, september 2003. Tilgængelig på: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990). Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000). Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002). Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998). Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

14) Kapitel B.34 i dette bilag, Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation.

15) Kapitel B.35 i dette bilag, Reproduktionstoksicitetsundersøgelse i to generationer.

16) Kapitel B.43 i dette bilag, Neurotoksicitetsundersøgelse i gnavere.

17) Kapitel B.31 i dette bilag, Prænatal udviklingstoksicitetsundersøgelse.

18) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål. EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33.

19) WHO (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Tilgængelig på: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

20) WHO (2001). Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Genève. Tilgængelig på: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995). Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.

22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997). Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997). The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977). Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989). Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979). Ontogeny of Learning and Memory. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.

27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987). Perinatal Development: A Psychobiological Perspective. Academic Press, Orlando.

28) Zoetis, T., Walls, I. (2003). Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research. ILSI Press, Washington, DC.

29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005). Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999). Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

31) ICH (1993). ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

32) Lochry, E.A. (1987). Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998). Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999). Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985). Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977). Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

38) Spear, L.P. (1990). Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

40) Adams, J. (1986). Methods in Behavioral Teratology. In: Handbook of Behavioral Teratology. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, s. 67-100.

41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979). Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

42) Robbins, T.W. (1977). A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, Handbook of Psychopharmacology, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, s. 37-82.

43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993). Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985). Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

45) 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: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997). Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998). A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. Physiol. Behav., 64:661-669.

48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977). A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

49) Davis, M. (1984). The mammalian startle response. In: Neural Mechanisms of Startle Behavior, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, s. 287-351

50) Koch, M. (1999). The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

51) Crofton, K.M. (1992). Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicology, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, s. 181-211.

52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989). Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994). Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res., 80:25-30.

54) Ison, J.R. (1984). Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437-445.

55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992). Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. In: TARGET Organ Toxicology Series: Neurotoxicity, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. s. 125-145.

56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990). Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

57) Bammer, G. (1982). Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

58) Bushnell, P.J. (1988). Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989). Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984). Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

61) Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989). The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

64) Vorhees, C.V. (1987). Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

65) Vorhees, C.V. (1997). Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988). Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983). Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981). Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000). Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994). Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Washington, DC, s. 84-107.

71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002). Theory and Practice of Histological Techniques, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996). Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000). Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001). Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994). Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Vralten-Besrenden, I.D.H., Ligander, M.M., Gundersen, H.J. (2005a). Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Vralten-Besrenden, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b). 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979). Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129-135.

79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998). Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy, Springer-Verlag, New York.

80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998). Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993). Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

82) Schmitz, C. (1997). Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

83) West, M.J. (1999). Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005). Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813-831.

85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994). Patterns of growth deficiency in rats exposed in utero to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995). Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

87) Jensen KF, Catalano SM. (1998). Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. In: Handbook of Developmental Neurotoxicology, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, s. 3-41.

88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000). Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056-1060.

90) Friede, R. L. (1989). Developmental Neuropathology. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.

91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992). Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996). Setting exposure standards: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

93) US EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

94) US EPA (1996). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

95) Miljøstyrelsen (1995). Neurotoxicology. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

97) Gad, S.C. (1989). Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 08:21-27.

98) Abby, H., Howard, E. (1973). Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975). Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992). Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985). Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004). A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an ad hoc working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006). A »best practices« approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992). The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985). Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008). Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):266-287.

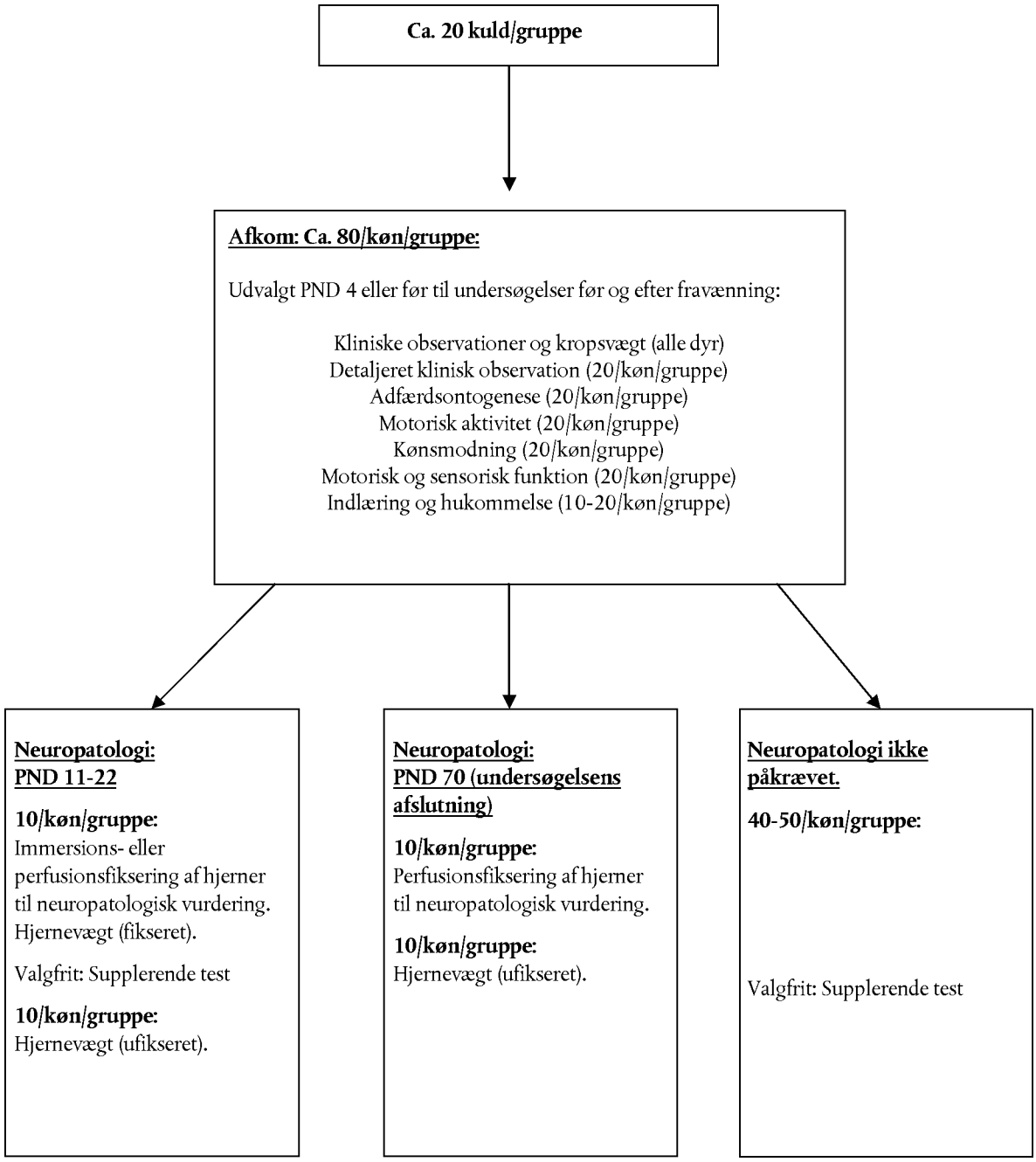
107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008). Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):288-325.

108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008). Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. Neurotoxicology and Teratology, 30(4):326-348.

109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008). Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints Neurotoxicology and Teratology, 30(4):349-381.

Figur 1

Generel forsøgsplan for funktionelle/adfærdsmæssige test, neuropatologisk evaluering og hjernevægt. Dette diagram er baseret på beskrivelsen i pkt. 13-15 (PND = postnatal day, dag 0 efter fødslen). Eksempler på fordeling af dyr er anført i tillæg 1.



Tillæg 1

1. Eksempler på mulige fordelinger er beskrevet og opstillet i tabelform nedenfor. Disse eksempler er anført for at illustrere, at fordelingen af forsøgsdyr til forskellige forsøgsparadigmer kan foretages på flere forskellige måder.

Eksempel 1

2. En gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til test vedrørende adfærdsudvikling før fravænning. Af disse dyr aflives 10 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) humant på PND 22. Hjernerne fjernes, vejes og præpareres til histopatologisk undersøgelse. Endvidere indsamles data om hjernevægt under anvendelse af ufikserede hjerner fra de resterende 10 hanner og 10 hunner pr. dosisniveau.

3. En anden gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til funktionelle/adfærdsmæssige test efter fravænning (detaljerede kliniske observationer, motorisk aktivitet, auditiv startle og kognitive funktionsforsøg hos unge voksne) og vurdering af alder ved kønsmodning. Af disse dyr bedøves 10 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) og fikseres via perfusion ved undersøgelsens afslutning (ca. PND 70). Efter supplerende fiksering in situ fjernes hjernen og præpareres til neuropatologisk undersøgelse.

4. Til kognitive funktionstest med unge voksne (f.eks. PND 60-70) anvendes en tredje gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld). Af disse dyr aflives 10 dyr/køn/gruppe (én han eller én hun pr. kuld) ved undersøgelsens afslutning, og hjernen fjernes og vejes.

5. De resterende 20 dyr/køn/gruppe udtages til evt. supplerende test.

Tabel 1

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Adfærdsudvikling
		10 m + 10 f	PND 22 hjernevægt/neuropatologi/morfometri
		10 m + 10 f	PND 22 hjernevægt
2	6	20 m + 20 f	Detaljerede kliniske observationer
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Kønsmodning
		20 m + 20 f	Motorisk og sensorisk funktion
		20 m + 20 f	Indlæring og hukommelse (PND 25)
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
3	7	20 m + 20 f	Indlæring og hukommelse (unge voksne)
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt ~ PND 70
4	8	—	Reservedyr til udskiftninger eller supplerende test

[a] Til dette eksempel reduceres kuldene ved aflivning til fire hanner og fire hunner. Hanunger nummereres fra 1 til 4, hununger fra 5 til 8.

Eksempel 2

6. En gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til test vedrørende adfærdsudvikling før fravænning. Af disse dyr aflives 10 unger/køn/dosisniveau (én han eller én hun pr. kuld) humant på PND 11. Hjernerne fjernes, vejes og præpareres til histopatologisk undersøgelse.

7. En anden gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (én han og én hun pr. kuld) bruges til undersøgelser efter fravænning (detaljerede kliniske observationer, motorisk aktivitet, vurdering af alder ved kønsmodning samt motorisk og sensorisk funktion). Af disse dyr bedøves 10 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) og fikseres via perfusion ved undersøgelsens afslutning (ca. PND 70). Efter supplerende fiksering in situ fjernes hjernen, vejes og præpareres til neuropatologisk undersøgelse.

8. Til kognitive funktionstest med unge og unge voksne anvendes 10 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld). Der anvendes forskellige dyr til forsøg med kognitive funktionstest på PND 23 og unge voksne. Ved afslutningen aflives de 10 dyr/køn/gruppe, der er testet som voksne, hjernen fjernes og vejes.

9. De resterende 20 dyr/køn/gruppe, der ikke er udvalgt til forsøg, aflives og kasseres ved fravænning.

Tabel 2.

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Adfærdsontogenese
		10 m + 10 f	PND 11 hjernevægt/neuropatologi/morfometri
2	6	20 m + 20 f	Detaljerede kliniske observationer
		20 m + 20 f	Motorisk aktivitet
		20 m + 20 f	Kønsmodning
		20 m + 20 f	Motorisk og sensorisk funktion
		10 m + 10 f	Ung voksen hjernevægt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
3	7	10 m + 10 f [b]	Indlæring og hukommelse (PND 23)
3	7	10 m + 10 f [b]	Indlæring og hukommelse (unge voksne)
			Ung voksen hjernevægt
4	8	—	Dyr aflives og kasseres PND 21.

[a] Til dette eksempel reduceres kuldene ved aflivning til fire hanner og fire hunner. Hanunger nummereres fra 1 til 4, hununger fra 5 til 8.
[b] Forskellige unger bruges til kognitive test på PND 23 og unge voksne (f.eks. lige/ulige kuld fra i alt 20).

Eksempel 3

10. En gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til hjernevejning og neuropatologisk undersøgelse på PND 11. Af disse dyr aflives 10 unger/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) humant på PND 11, og hjerner fjernes, vejes og præpareres til histopatologisk undersøgelse. Endvidere indsamles data om hjernevægt under anvendelse af ufikserede hjerner fra de resterende 10 hanner og 10 hunner pr. dosisniveau.

11. En anden gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til adfærdsontogenese (motorisk aktivitet) undersøgelser efter fravænning (motorisk aktivitet og vurdering af alder ved kønsmodning) samt kognitive funktionstest med unge

12. Endnu en gruppe på 20 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han og én hun pr. kuld) bruges til motoriske og sensoriske funktionstest (auditiv startle) og detaljerede kliniske observationer. Af disse dyr bedøves 10 dyr/køn/dosisniveau (dvs. én han eller én hun pr. kuld) og fikseres via perfusion ved undersøgelsens afslutning (ca. PND 70). Efter supplerende fiksering in situ fjernes hjernen, vejes og præpareres til neuropatologisk undersøgelse.

13. En anden gruppe på 20 unger/køn/dosisniveau anvendes til kognitive funktionstest med unge voksne (dvs. én han og én hun pr. kuld). Af disse dyr aflives 10 dyr/køn/gruppe (dvs. én han eller én hun pr. kuld) ved undersøgelsens afslutning, og hjernen fjernes og vejes.

Tabel 3

Unge nr. [a]		Antal unger fordelt til test	Undersøgelse/Test
m	f		
1	5	10 m + 10 f 10 m + 10 f	PND 11 hjernevægt/neuropatologi/morfometri PND 11 hjernevægt
2	6	20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f 20 m + 20 f	Adfærdsontogenese (motorisk aktivitet) Motorisk aktivitet Kønsmodning Indlæring og hukommelse (PND 27)
3	7	20 m + 20 f 20 m + 20 f 10 m + 10 f	Auditiv startle (unge og unge voksne) Detaljerede kliniske observationer Ung voksen hjernevægt/neuropatologi/morfometri ~ PND 70
4	8	20 m + 20 f 10 m + 10 f	Indlæring og hukommelse (unge voksne) Ung voksen hjernevægt

[a] Til dette eksempel reduceres kuldene ved aflivning til fire hanner og fire hunner. Hanunger nummereres fra 1 til 4, hununger fra 5 til 8.

Tillæg 2

Definitioner

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

B.54. UTERUSTESTEN I GNAVERE: EN KORTTIDSSCREENINGTEST FOR ØSTROGENECITET

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 440 (2007). OECD indledte en højt prioriteret aktivitet i 1998 med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og test af potentielt hormonforstyrrende stoffer (1). Ét element i denne aktivitet var at udvikle en testvejledning for det uterotrofiske bioassay med gnavere. Det uterotrofiske bioassay med gnavere blev herefter underkastet et omfattende valideringsprogram, herunder udarbejdelse af et detaljeret background document (2)(3) og gennemførelse af omfattende intra- og interlaboratorieundersøgelser for at vise bioassayets relevans og reproducerbarhed med et potent referenceøstrogen, en stærk østrogenreceptoragonist og et negativt referencekemikalie (4)(5)(6)(7)(8)(9). Denne testmetode B.54 bygger på erfaringerne fra valideringstestprogrammet og de derved opnåede resultater med østrogenagonister.

2. Det uterotrofiske bioassay er en korttidsscreeningtest, der havde sin oprindelse i 1930'erne (27)(28) og først blev standardiseret til screening af et ekspertudvalg i 1962 (32)(35). Det er baseret på forøgelsen af uterusvægt eller uterotrofisk respons (se gennemgang i 29). Det evaluerer et kemikalies evne til at fremkalde biologiske aktiviteter i overensstemmelse med agonister eller antagonister i naturlige østrogener (f.eks. 17ß-estradiol). Det bruges dog langt mindre til påvisning af antagonister end af agonister. Uterus reagerer på østrogener på to måder. En første reaktion er en vægtforøgelse på grund af vandimbibition. Denne reaktion efterfølges af vægtforøgelse på grund af vævsvækst (30). Uterusreaktioner hos rotter og mus er kvalitativt sammenlignelige.

3. Dette bioassay tjener som et in vivo-screeningassay, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med »OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (tillæg 2). I denne konceptramme ligger det uterotrofiske bioassay på niveau 3 som et in vivo-assay, der giver data om en enkelt endokrin mekanisme, nemlig østrogenicitet.

4. Det uterotrofiske bioassay er beregnet til at blive inkluderet i en række in vitro- og in vivo-test med henblik på at afdække kemikalier med potentiale til at interagere med det endokrine system, så man i sidste ende kan foretage vurderinger af risici for menneskers sundhed og miljøet. OECD's valideringsprogram anvendte både stærke og svage østrogenagonister til at vurdere, hvor effektivt assayet kan identificere østrogene kemikalier (4)(5)(6)(7)(8). Derved blev testprocedurens følsomhed over for østrogenagonister påvist ud over en god reproducerbarhed i og mellem laboratorier.

5. Med hensyn til negative kemikalier blev der kun medtaget ét »negativt« referencekemikalie, der allerede var rapporteret negativt ved uterotrofisk assay samt in vitro-receptorbinding og receptorassays i valideringsprogrammet, men supplerende testdata, som ikke vedrørte OECD-valideringsprogrammet, er blevet evalueret og har yderligere underbygget specificiteten af det uterotrofiske bioassay til screening for østrogenagonister (16).

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

6. Østrogenagonister og -antagonister fungerer som ligander for østrogenreceptorer a og b og kan henholdsvis aktivere eller hæmme receptorernes transkriptionsaktivitet. Dette kan potentielt føre til sundhedsrisici, herunder skadevirkninger for reproduktion og udvikling. Derfor er der behov for hurtigt at kunne vurdere og evaluere et kemikalie som en mulig østrogenagonist eller -antagonist. Selv om en ligands affinitet for en østrogenreceptor eller transkriptionsaktivering af reportergener in vitro er informativ, er det kun en af flere determinanter for mulig fare. Andre determinanter kan omfatte metabolisk aktivering og deaktivering ved optagelse i kroppen, fordeling til målvæv og clearance fra kroppen, i hvert fald delvis afhængigt af indgiftsvejen og det kemikalie, der testes. Dette medfører behov for at screene et kemikalies mulige aktivitet in vivo under relevante betingelser, medmindre kemikaliets kendetegn vedrørende Absorption — Distribution — Metabolisme — Eliminering (ADME) allerede giver tilstrækkelig information. Uterusvæv reagerer med hurtig og kraftig vækst på stimulering med østrogener, især hos forsøgsgnavere, hvor brunstcyklussen varer ca. fire dage. Gnaverarter, navnlig rotten, anvendes også bredt i toksicitetsundersøgelser til risikobeskrivelse. Derfor er gnaverens uterus et egnet målorgan for in vivo-screening af østrogenagonister og -antagonister.

7. Denne testmetode er baseret på de protokoller, der blev anvendt i OECD's valideringsundersøgelse, og som har vist sig at være pålidelige og repeterbare i intra- og interlaboratorieundersøgelser (5)(7). I øjeblikket findes der to metoder, nemlig den ovariektomiserede metode for voksne hunner (OVX-voksen-metode) og den ikkekønsmodne

ikkeovariektomiserede metode (den ikkekønsmodne metode). Det blev påvist i OECD-valideringstestprogrammet, at begge metoder har sammenlignelig følsomhed og reproducerbarhed. Da den ikkekønsmodne metode har en intakt HPG-akse (hypotalamus-hypofyse-gonade) er den dog noget mindre specifik, men dækker et bredere undersøgelsesområde end det ovariektomiserede dyr, fordi den kan reagere på kemikalier, der interagerer med HPG-aksen i stedet for blot østrogenreceptoren. Rottens HGP-akse er funktionel omkring 15-dages alderen. Før kan puberteten ikke fremskyndes med behandlinger som GnRH. Da hunner begynder at komme i puberteten før åbningen af vagina, vil hunnen have flere stille cyklusser, der ikke fører til vaginalåbning eller ovulation, men der er visse hormonale svingninger. Hvis et kemikalie stimulerer HPG-aksen direkte eller indirekte, medfører det for tidligt indtrædende pubertet, tidlig ovulation og fremskyndet vaginalåbning. Det er ikke kun kemikalier, der påvirker HPG-aksen, som gør dette, men nogle former for foder med højere niveauer af omsættelig energi end andre vil stimulere vækst og fremskynde vaginalåbning uden at være østrogene. Sådanne kemikalier vil ikke fremkalde en uterotrofisk reaktion ved OVX på voksne dyr, da deres HPG-akse ikke fungerer.

8. Af hensyn til dyrevelfærden foretrækkes metoden med ikkekønsmodne rotter, da man undgår kirurgisk forbehandling af dyrene og også undgår, at dyr, som ser ud til at være ved at gå i brunst, evt. ikke anvendes (se pkt. 30).

9. Den uterotrofiske respons har ikke udelukkende østrogen oprindelse, dvs. at andre kemikalier end østrogenagonister og -antagonister også kan give en reaktion. F.eks. kan relativt høje doser af progesteron, testosteron eller forskellige syntetiske progestiner alle føre til en stimulerende reaktion (30). En evt. reaktion kan analyseres histologisk for keratinisering og forhorning af vagina (30). Uanset reaktionens mulige oprindelse bør et positivt udfald af et uterotrofisk bioassay normalt give anledning til handling med henblik på yderligere afklaring. Supplerende tegn på østrogenicitet kan komme fra in vitro-assays såsom assays om ER-binding og transkriptionsaktivering eller fra andre in vivo-assays såsom assayet om kvindelig pubertet.

10. Under hensyntagen til, at det uterotrofiske bioassay fungerer som et in vivo-screeningassay, tjente den anvendte valideringstilgang både dyrevelfærdshensyn og en trinvis teststrategi. Med henblik herpå bestræbte man sig på at foretage en streng validering af reproducerbarhed og følsomhed for østrogenicitet — den vigtigste bekymring i forbindelse med mange kemikalier — mens antiøstrogenecitetselementet i assayet ikke fik megen opmærksomhed. Kun ét antiøstrogen med stærk aktivitet blev testet, eftersom antallet af kemikalier med en klar antiøstrogen profil (ikke tilsløret af en vis østrogenaktivitet) er meget begrænset. Således er denne testmetode dedikeret til den østrogene protokol, mens protokollen med beskrivelse af assayets antagonistform er indeholdt i en vejledning (37). Assayets reproducerbarhed og følsomhed for kemikalier med rent antiøstrogen aktivitet vil blive tydeligere defineret senere, når testproceduren har været anvendt rutinemæssigt i nogen tid, og flere kemikalier med denne virkningsmodalitet er blevet identificeret.

11. Det er anerkendt, at alle dyrebaserede procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af dyr. Nedenstående beskrivelser af pleje og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (38). OECD har udarbejdet yderligere vejledning om human behandling af dyr (25).

12. Som med alle assays, der anvender levende dyr, er det væsentligt at sikre, at dataene virkelig er nødvendige, før assayet påbegyndes. Eksempler på to forhold, hvor data kan være påkrævet:

— højt eksponeringspotentiale (niveau 1 i konceptrammen, tillæg 2) eller tegn på østrogenicitet (niveau 2) for at undersøge, hvorvidt sådanne virkninger kan optræde in vivo

— virkninger, der indikerer østrogenicitet i in vivo-test på niveau 4 eller 5, for at underbygge, at virkningerne var knyttet til en østrogen mekanisme, som ikke kan klarlægges ved hjælp af in vitro-test.

13. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

14. Af hensyn til følsomheden bygger det uterotrofiske bioassay på et dyreforsøgssystem, hvor hypotalamus-hypofyse-ovarieaksen ikke er funktionel, hvilket fører til lave endogene niveauer af cirkulerende østrogen. Det vil sikre, at uterus har en lav udgangsvægt, og at der bliver en maksimal spredning af reaktioner på indgivne østrogener. To østrogenfølsomme tilstande hos hungnavere opfylder dette krav:

i) ikkekønsmodne hunner efter fravænning og før pubertet

ii) unge voksne hunner efter ovariektomi med tilstrækkelig tid til regression af uterusvævet.

15. Testkemikaliet indgives dagligt ved oral sonde eller subkutan injektion. Graduerede testkemikaliedoser indgives til mindst to behandlingsgrupper (se vejledning i pkt. 33) af forsøgsdyr med ét dosisniveau pr. gruppe og en indgiftsperiode på tre på hinanden følgende dage for den ikkekønsmodne metode og en indgiftsperiode på mindst tre på hinanden følgende dage for OVX-voksen-metoden. Dyrene obduceres ca. 24 timer efter den sidste dosis. For østrogenagonister undersøges behandlede dyregruppers gennemsnitlige uterusvægt i forhold til vehikelgruppen for en statistisk signifikant forøgelse. En statistisk signifikant forøgelse i gennemsnitlig uterusvægt for en testgruppe viser en positiv respons i dette bioassay.

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af dyreart

16. Der kan bruges almindeligt anvendte gnaverstammer. Som eksempel blev Sprague-Dawley og Wistar-stammer af rotter anvendt under valideringen. Stammer med uteri, som man ved eller har mistanke om, er mindre responsive, bruges ikke. Laboratoriet skal påvise den anvendte stammes følsomhed som foreskrevet i pkt. 26 og 27.

17. Rotter og mus er rutinemæssigt blevet anvendt i det uterotrofiske bioassay siden 1930'erne. OECD's valideringsundersøgelser blev kun udført med rotter baseret på en forståelse af, at begge arter forventes at være ækvivalente, og derfor burde én art være nok til den globale validering med henblik på at spare ressourcer og dyr. Rotten er den foretrukne art i de fleste reproduktions- og udviklingstoksicitetsundersøgelser. Eftersom der findes en omfattende historisk database for mus og for derfor at udvide anvendelsesområdet for den uterotrofiske bioassay-testmetode med gnavere til anvendelsen af mus som forsøgsarter, blev der udført en begrænset opfølgende valideringsundersøgelse med mus (16). En »bridging«-metode med et begrænset antal testkemikalier og deltagende laboratorier og uden kodet stikprøvetest blev valgt i overensstemmelse med det oprindelige ønske om at spare ressourcer og dyr. Denne »bridging«-valideringsundersøgelse viser for det uterotrofiske bioassay med unge vokse ovariektomiserede mus, at data opnået med rotter og mus kvalitativt og kvantitativt stemmer udmærket overens. Selv om resultatet af det uterotrofiske bioassay måske er foreløbigt i forhold til en langtidsundersøgelse, giver det mulighed for, at dyr fra den samme stamme og kilde kan anvendes i begge undersøgelser. »Bridging«-metoden blev begrænset til OVX-mus, og rapporten giver ikke et robust datasæt, der kan validere den ikkekønsmodne model. Den ikkekønsmodne model for mus kommer således ikke i betragtning under den nuværende testmetodes anvendelsesområde.

18. I nogle tilfælde kan mus derfor anvendes i stedet for rotter. Denne art skal begrundes i toksikologiske, farmakokinetiske og/eller andre kriterier. Ændringer i protokollen kan være nødvendige for mus. F.eks. er mus' fødeindtagelse målt på kropsvægt højere end rotters, og derfor skal det fytoøstrogene indhold i foderet være lavere for mus end for rotter(9)(20)(22).

Miljøbetingelser og fodring

19. Alle procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Disse beskrivelser af pasning og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (38). Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke.

20. Laboratoriefoder og drikkevand gives ad libitum. Unge voksne dyr kan opbevares i bure hver for sig eller i grupper på op til tre dyr. På grund af de ikkekønsmodne dyrs unge alder anbefales social gruppeanbringelse

21. Et højt fytoøstrogenniveau i laboratoriefoder er kendt for at øge uterusvægten hos gnavere i tilstrækkelig grad til at påvirke det uterotrofiske bioassay (13)(14)(15). Et højt niveau af fytoøstrogener og omsættelig energi i laboratoriefoder kan også føre til tidlig pubertet, hvis der anvendes ikkekønsmodne dyr. Tilstedeværelsen af fytoøstrogener stammer primært fra tilsætningen af soja- og lucerneprodukter i laboratoriefoderet, og koncentrationer af fytoøstrogener i standardlaboratoriefoder har vist sig at variere fra batch til batch (23). Kropsvægt er en vigtig variabel, da den hænger sammen med mængden af indtaget foder. Derfor varierer den faktisk indtagne dosis fytoøstrogen fra samme foder mellem arter og efter alder (9). For ikkekønsmodne hunrotter kan fødeindtagelsen målt efter kropsvægt være ca. det dobbelte af indtagelsen for ovariektomiserede unge voksne hunner. For unge voksne mus kan fødeindtagelsen målt efter kropsvægt være næsten det firedobbelte af indtagelsen for ovariektomiserede unge voksne hunrotter.

22. Resultater af det uterotrofiske bioassay (9)(17)(18)(19) viser imidlertid, at begrænsede mængder af fytoøstrogener i foderet er acceptabelt og ikke reducerer bioassayets følsomhed. Vejledende bør fytoøstrogenniveauerne i foder ikke overstige 350 µg genistein-ækvivalenter/gram laboratoriefoder til ikkekønsmodne Sprague Dawley- og Wistar-hunrotter (6)(9). Et sådant foder bør også være passende ved test på unge voksne ovariektomiserede rotter, fordi fødeindtagelsen målt efter kropsvægt er mindre hos unge voksne sammenlignet med ikkekønsmodne dyr. Hvis voksne ovariektomiserede mus eller mere fytoøstrogenfølsomme rotter anvendes, skal man overveje en forholdsmæssig reduktion i fytoøstrogenniveauet i foderet (20). Endvidere kan forskelle i tilgængelig metabolisk energi fra forskelligt foder føre til tidsforskydninger i pubertetens start (21)(22).

23. Forud for undersøgelsen kræves en omhyggelig udvælgelse af foder uden et højt fytoøstrogenniveau (se vejledning (6)(9)) eller metabolisk energi, der kan forstyrre resultaterne (15)(17)(19)(22)(36). Det er en vigtig kontrol af begge disse faktorer at sikre, at laboratoriets testsystem fungerer korrekt som fastsat i pkt. 26 og 27. Som en beskyttelsesforanstaltning i overensstemmelse med god laboratoriepraksis (GLP) udtages der repræsentative prøver af hver batch foder, som indgives i løbet af undersøgelsen, med henblik på mulig analyse af fytoøstrogenindholdet (f.eks. i tilfælde af høj uteruskontrolvægt i forhold til tidligere kontroller eller en uhensigtsmæssig respons på referenceøstrogenet, 17-alfa-ethinylestradiol). Alikvoter analyseres som led i undersøgelsen eller fryses ved – 20 °C eller på en sådan måde, at prøven ikke nedbrydes før analyse.

24. Nogle former for strøelse kan indeholde naturligt forekommende østrogene eller antiøstrogene kemikalier (f.eks. er det kendt, at majskolber påvirker rotters cyklus og ser ud til at være antiøstrogene). Det valgte strøelsesmateriale skal indeholde så lidt østrogen som muligt.

Forberedelse af dyr

25. Forsøgsdyr uden tegn på sygdom eller fysiske abnormiteter tilordnes vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupper. Burene anbringes således, at mulige virkninger som følge af burenes placering minimeres. Dyrene mærkes individuelt. Ikkekønsmodne dyr opbevares helst i bur med moderdyr eller plejemoderdyr indtil fravænning under akklimatisering. Akklimatiseringsperioden forud for undersøgelsens start skal være omkring fem dage for unge voksne dyr og for ikkekønsmodne dyr leveret med moderdyr eller plejemoderdyr. Såfremt der fås fravænnede ikkekønsmodne dyr uden moderdyr, kan en kortere akklimatiseringsperiode blive nødvendig, da dosering skal starte umiddelbart efter fravænning (se pkt. 29).

FREMGANGSMÅDE

Kontrol af laboratoriets kompetence

26. Der er to forskellige muligheder for at kontrollere laboratoriets kompetence:

— periodisk kontrol i forhold til en indledende positiv grundkontrolundersøgelse (se pkt. 27). Mindst hver sjette måned og hver gang der sker en ændring, som kan påvirke assayets resultater (f.eks. en ny foderformulering, ændringer i dissektionspersonale, ændring af dyrestamme eller -leverandør osv.), skal testsystemets (dyremodellens) responsivitet kontrolleres ved hjælp af en passende dosis (baseret på den positive grundkontrol, jf. pkt. 27) af et referenceøstrogen: 17a-ethinylestradiol (CAS-nr. 57-63-6) (EE)

— brug af sideløbende kontroller ved at inkludere en gruppe, som får en passende dosis referenceøstrogen, i hvert assay.

Reagerer systemet ikke som forventet, skal testbetingelserne undersøges og ændres i overensstemmelse hermed. Det anbefales, at den dosis referenceøstrogen, der skal anvendes ved hver tilgang, er ca. ED70-80.

27. **Positiv grundkontrolundersøgelse** — Før et laboratorium første gang gennemfører en undersøgelse i henhold til denne testmetode,påvises laboratoriets kompetence gennem en test af dyremodellens responsivitet ved at fastlægge et referenceøstrogens dosisrespons: 17a-ethinylestradiol (CAS-nr. 57-63-6) (EE) med minimum fire doser. Uterusvægtrespons sammenlignes med etablerede tidligere data (se reference (5)). Hvis denne positive grundkontrol ikke giver de forventede resultater, undersøges testbetingelserne og ændres.

Dyrenes antal og vilkår

28. Hver behandlings- og kontrolgruppe skal omfatte mindst seks dyr (gælder protokoller for både den ikkekønsmodne og OVX-voksen-metoden).

Ikkekønsmodne dyrs alder

29. Til det uterotrofiske bioassay med ikkekønsmodne dyr skal fødselsdatoen anføres. Doseringen skal begynde tidligt nok til at sikre, at den fysiologiske forøgelse af endogene østrogener i forbindelse med puberteten endnu ikke har fundet sted, når indgiften af testkemikaliet afsluttes. På den anden side er der tegn på, at meget unge dyr kan være mindre følsomme. Ved definering af den optimale alder skal hvert laboratorium tage udgangspunkt i sine egne baggrundsdata om kønsmodning.

Som generel vejledning kan dosering af rotter begynde straks efter en tidlig fravænning på PND 18 (idet dagen for fødslen er PND 0). Dosering af rotter skal helst fuldføres på PND 21, men under alle omstændigheder før PND 25, for efter den alder bliver hypothalamus-hypofyse-ovarie-aksen funktionel, og det endogene østrogenniveau kan begynde at stige med en samtidig stigning i uterus' gennemsnitlige basislinjevægt og en stigning i gruppens standardafvigelser (2)(3)(10)(11)(12).

Procedure for ovariektomi

30. For ovariektomiserede hunrotter og -mus (behandlings- og kontrolgrupper) foretages ovariektomi i 6-8-ugersalderen. For rotter skal der gå mindst 14 dage mellem ovariektomi og den første dags indgift for at give uterus mulighed for at trække sig sammen til en minimal stabil basislinje. For mus skal der gå mindst syv dage mellem ovariektomi og den første dags indgift. Da små mængder ovarievæv er tilstrækkelige til at producere betydelige mængder af cirkulerende østrogen (3), skal dyrene testes før brug ved at observere epithelceller skrabet fra vagina i mindst fem på hinanden følgende dage (f.eks. dag 10-14 efter ovariektomi for rotters vedkommende). Hvis dyrene viser tegn på, at de er ved at gå i brunst, skal de ikke bruges. Ved obduktion skal ovariestilkene undersøges for tegn på evt. tilstedeværelse af ovarievæv. I givet fald skal dyret ikke anvendes i beregningerne (3).

31. Ovariektomiproceduren begynder med, at dyret bedøves korrekt og lægges på maven. Incisionen til åbning af den dorsolaterale abdominalvæg skal være ca. 1 cm på langs ved midtpunktet mellem ribbenenes margo inferior og crista iliaca og nogle få millimeter lateralt i forhold til lændemusklens laterale kant. Ovariet fjernes fra bughulen til et aseptisk felt. Ovariet skæres fra ved overgangen mellem æggeleder og corpus uteri. Efter bekræftelse af, at der ikke forekommer massiv blødning, lukkes abdominalvæggen med sutur, og huden lukkes med autoclips eller egnet sutur. Ligaturpunkterne vises skematisk i figur 1. Passende postoperativ analgesi bruges som anbefalet af en dyrlæge med erfaring i pleje af gnavere.

Kropsvægt

32. I OVX-voksen-metoden hænger kropsvægt og uterusvægt ikke sammen, fordi uterusvægten påvirkes af hormoner såsom østrogener, men ikke af vækstfaktorer, der regulerer kropsstørrelsen. Derimod hænger kropsvægten sammen med uterusvægten i den ikkekønsmodne model under kønsmodning (34). Ved påbegyndelse af undersøgelsen skal vægtvariationen for de anvendte dyr i den ikkekønsmodne model derfor være minimal og må ikke

overstige ± 20 % af middelvægten. Det betyder, at kuldstørrelsen skal være standardiseret af producenten for at sikre, at afkom fra andre moderdyr bliver fodret med det samme. Dyr tilordnes til grupper (kontrol- og behandlingsgrupper) ved randomiseret vægtfordeling, således at hver gruppes gennemsnitlige kropsvægt ikke er statistisk anderledes end en anden gruppes. Man skal, så vidt det er praktisk muligt, være opmærksom på ikke at tilordne dyr fra samme kuld til samme behandlingsgruppe uden at øge antallet af kuld, der anvendes til undersøgelsen.

Dosering

33. For at fastslå, om et testkemikalie kan have østrogen virkning in vivo, er to dosisgrupper og en kontrolgruppe normalt tilstrækkeligt, og dette design foretrækkes derfor af hensyn til dyrevelfærden. Hvis formålet er enten at opnå en dosisrepræsentativ kurve eller at ekstrapolere til lavere doser, er der behov for mindst tre dosisgrupper. Hvis der kræves information ud over identificeringen af østrogen aktivitet (såsom et skøn over styrke), må man overveje et andet dosisregime. Med undtagelse af behandling med testkemikaliet behandles dyr i kontrolgruppen på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der bruges et vehikel til indgift af testkemikaliet, skal kontrolgruppen modtage den samme mængde vehikel, som bruges til den behandlede gruppe (eller den største mængde, der bruges til testgrupperne, hvis der er forskel grupperne imellem).

34. Formålet i tilfælde af det uterotrofiske bioassay er at vælge doser, der sikrer dyrenes overlevelse, og som er uden væsentlig toksicitet eller lidelse for dyrene efter tre på hinanden følgende dages indgift af kemikaliet indtil en maksimal dosis på 1 000 mg/kg/dag. Alle dosisniveauer foreslås og vælges under hensyntagen til evt. eksisterende toksicitets- og (toksiko-)kinetiske data om testkemikaliet eller materiale i den forbindelse. Med hensyn til det højeste dosisniveau skal der først tages hensyn til LD50 og/eller information om akut toksicitet for at undgå død eller alvorlig lidelse for dyrene (24)(25)(26). Den højeste dosis repræsenterer den maksimalt tolererede dosis (MTD). En undersøgelse foretaget med et dosisniveau, som skabte en positiv uterotrofisk respons, ville også blive godkendt. Til screening er store intervaller (f.eks. enheder a en halv logaritme svarende til en dosisprogression på 3,2 eller op til enheder a en logaritme) mellem doseringerne normalt acceptable. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres en range-finding-undersøgelse til bestemmelse af de doser, der skal anvendes.

35. Hvis den østrogene styrke for en agonist kan anslås ved in vitro- (eller in silico-) data, kan disse alternativt inddrages med henblik på valg af dosis. F.eks. anslås den mængde af testkemikaliet, som vil fremkalde uterotrofisk respons svarende til referenceagonisten (ethinylestradiol), efter sine relative in vitro-styrker i forhold til ethinylestradiol. Man vil få den højeste testdosis ved at gange denne ækvivalente dosis med en passende faktor, f.eks. 10 eller 100.

Overvejelser over »range-finding«

36. Om nødvendigt kan der udføres en range-finding-undersøgelse med nogle få dyr. I den forbindelse kan OECD's vejledning nr. 19 (25) bruges til at definere kliniske tegn på toksicitet eller lidelse for dyrene. Såfremt det er muligt inden for denne range-finding-undersøgelse, kan uteri efter tre dages indgift eksciseres og vejes ca. 24 timer efter den sidste dosis. Disse data kan herefter bruges som input til design af hovedundersøgelsen (vælg en acceptabel maksimumsdosis og lavere doser, og anbefal antallet af dosisgrupper).

Indgift af doser

37. Testkemikaliet indgives ved oral sonde eller subkutan injektion. Dyrevelfærdshensyn og toksikologiske aspekter såsom relevansen for den måde, hvorpå mennesker eksponeres for kemikaliet (f.eks. oral sonde til modelindtagelse, subkutan injektion til modelinhalation eller dermal absorption), testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber og især eksisterende toksikologisk information og data om metabolisme og kinetik (f.eks. behov for at undgå førstepassage-metabolisme, bedre effektivitet ad en særlig vej) skal tages i betragtning ved valg af indgiftsvej.

38. Det anbefales først at overveje en vandig opløsning/suspension, hvor det er muligt. Men da de fleste østrogene ligander eller deres metaboliske prækursorer normalt er hydrofobe, er den mest almindelige fremgangsmåde at anvende en opløsning/suspension i olie (f.eks. majs-, jordnødde-, sesam- eller olivenolie). Disse olier har imidlertid forskelligt kalorie- og fedtindhold, og vehiklet kan derfor påvirke det samlede indtag af omsættelig energi og derved potentielt ændre de målte endepunkter såsom uterusvægt, især ved den ikkekønsmodne metode (33). Forud for undersøgelsen testes derfor ethvert vehikel, der skal anvendes, i forhold til kontrolgrupper uden vehikel.

Testkemikalier kan opløses i en minimal mængde på 95 % ethanol eller andre egnede opløsningsmidler og fortyndes til endelige arbejdskoncentrationer i testvehiklet. Opløsningsmidlets toksiske karakteristika skal være kendt og testes i en særskilt kontrolgruppe, som kun får opløsningsmiddel. Hvis testkemikaliet anses for stabilt, kan svag opvarmning og kraftig mekanisk påvirkning bruges til at fremme opløsningen af testkemikaliet. Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes. Er testkemikaliet stabilt, mens undersøgelsen står på, kan en startalikvot af testkemikaliet klargøres, og de angivne fortyndinger af dosis tilberedes dagligt.

39. Doseringstidspunktet vil afhænge af den anvendte model (jf. pkt. 29 om den ikkekønsmodne model og pkt. 30 om OVX-voksen-modellen). Ikkekønsmodne hunrotter doseres dagligt med testkemikaliet i tre på hinanden følgende dage. En tredages behandling anbefales også til ovariektomiserede hunrotter, men længere eksponeringer er acceptable og kan forbedre detektionen af svagt aktive kemikalier. For ovariektomiserede hunmus skulle en anvendelsesvarighed på tre dage være tilstrækkeligt uden en væsentlig fordel ved en udvidelse på op til syv dage for stærke østrogenagonister. Denne sammenhæng blev dog ikke påvist for svage østrogener i valideringsundersøgelsen (16), så doseringen skal udvides til syv på hinanden følgende dage for OVX-voksne mus.Dosis indgives på samme tidspunkter hver dag. Doserne justeres efter behov, så der bevares en konstant dosis i forhold til dyrets kropsvægt (f.eks. mg af testkemikaliet pr. kg kropsvægt pr. dag). Med hensyn til testvolumen skal variationen på grundlag af kropsvægt begrænses ved at justere koncentrationen af testopløsningen for at sikre et konstant volumen på grundlag af kropsvægt ved alle dosisstørrelser og for alle indgiftsveje.

40. Når testkemikaliet indgives ved sonde, skal dyrene have det i en enkeltdosis ved hjælp af en gastrisk sonde eller et passende intubationsrør. Hvor stor en daglig væskemængde, der kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Lokale retningslinjer for pleje af dyr skal følges, men mængden bør ikke overstige 5 ml/kg kropsvægt undtagen i tilfælde af vandige opløsninger, hvor der kan bruges 10 ml/kg kropsvægt.

41. Når testkemikaliet indgives ved subkutan injektion, skal det ske i en enkelt daglig dosis. Doserne indgives i de dorsoskapulære og lumbale regioner via steril nål (f.eks. kaliber 23 eller 25) og en tuberkulinsprøjte. Det er valgfrit, om injektionsområdet barberes. Evt. tab eller lækage på injektionsstedet eller ufuldstændig dosering registreres. Den samlede injicerede mængde pr. rotte pr. dag må ikke overstige 5 ml/kg kropsvægt fordelt på to injektionssteder undtagen i tilfælde af vandige opløsninger, hvor der kan bruges 10 ml/kg kropsvægt.

Bemærkninger

Generelle og kliniske observationer

42. Generelle kliniske observationer foretages mindst én gang om dagen og hyppigere, hvis der observeres tegn på toksicitet. Observationer skal helst udføres på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til perioden for den forventede maksimale virkning efter dosering. Alle dyr observeres for mortalitet, morbiditet og generelle kliniske tegn såsom ændringer i adfærd, hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster).

Kropsvægt og foderindtagelse

43. Alle dyr vejes dagligt til nærmeste 0,1 g fra indledningen af behandlingen, dvs. når dyrene fordeles i grupper. Som valgfri måling kan mængden af indtaget foder i behandlingsperioden måles pr. bur ved at veje fodringssystemerne. Resultaterne for foderindtagelsen udtrykkes i gram pr. rotte pr. dag.

Dissektion og måling af uterusvægt

44. 24 timer efter den sidste behandling aflives rotterne humant. Ideelt set skal obduktionsrækkefølgen være vilkårlig på tværs af grupperne for at undgå progression direkte op eller ned i forhold til dosisgrupper, som kan påvirke dataene lidt. Formålet med bioassayet er at måle både vådvægten og tørvægten af uterus. Vådvægten omfatter uterus og luminalvæskeindhold. Tørvægten måles, efter at luminalindholdet af uterus er blevet presset ud og fjernet.

45. Før dissektion skal vagina undersøges med hensyn til åbningsstatus hos ikkekønsmodne dyr. Dissektionsproceduren begynder ved at åbne abdominalvæggen ved skambenssymfysen. Herefter fjernes evt. livmoderhorn og ovarier fra den dorsale abdominalvæg. Urinblære og urinledere fjernes fra den ventrale og laterale side af uterus og vagina. Fibrøs adhæsion mellem rektum og vagina fjernes, til forbindelsespunktet mellem vaginalåbning og perinealhud kan identificeres. Uterus og vagina frigøres fra kroppen ved foretage en incision i vaginalvæggen lige over forbindelsespunktet i perinealhuden som vist i figur 2. Uterus fjernes fra kropsvæggen ved forsigtigt at skære det uterine mesenterium dorsolateralt ved tilhæftningspunktet i hele længden af hvert livmoderhorn. Når uterus er fjernet fra kroppen, skal håndteringen gå tilstrækkelig hurtigt til, at vævsudtørring undgås. Vægttab på grund af udtørring bliver større ved små væv såsom uterus (23). Er der ovarier, fjernes disse ved æggelederen, idet tab af luminalvæske fra livmoderhornet undgås. Såfremt dyret er blevet ovariektomiseret, undersøges ovariestilkene for tilstedeværelse af evt. ovarievæv. Overskydende fedt og bindevæv renses væk. Vagina fjernes fra uterus lige under cervix, således at cervix forbliver sammen med corpus uteri som vist i figur 2.

46. Hver uterus overføres til en entydigt mærket og vejet beholder (f.eks. en petriskål eller et plastvejekar), idet man fortsat omhyggeligt undgår udtørring før vejning (f.eks. kan filterpapir, der er let fugtet med saltvand, lægges i beholderen). Uterus med luminalvæske vejes til nærmeste 0,1 mg (uterus' vådvægt).

47. Hver uterus behandles herefter individuelt med henblik på fjernelse af luminalvæske. Begge livmoderhorn perforeres eller skæres på langs. Uterus placeres på et let fugtigt filterpapir (f.eks. Whatman nr. 3) og presses forsigtigt med et andet stykke let fugtigt filterpapir, så luminalvæsken fjernes helt. Uterus uden luminalvæske vejes til nærmeste 0,1 mg (uterus' tørvægt).

48. Vægten af uterus ved testens afslutning kan bruges til at sikre, at den ikkekønsmodne intakte rottes rette alder ikke blev overskredet. Dog er tidligere data om den rottestamme, laboratoriet anvendte, afgørende i den forbindelse (se pkt. 56 med hensyn til fortolkning af resultaterne).

Valgfrie undersøgelser

49. Efter vejning kan uterus fikseres i 10 % neutral bufferformalin med henblik på histopatologisk undersøgelse efter hematoxylin-eosin (HE)-farvning. Vagina kan undersøges i overensstemmelse hermed (se pkt. 9). Endvidere kan der med henblik på kvantitativ sammenligning foretages en morfometrisk måling af endometrial epithelium.

DATA OG RAPPORTERING

Data

50. Undersøgelsesdataene skal omfatte:

— antal dyr ved assayets start

— antal dyr, der blev fundet døde under assayet eller aflivet af humane grunde, og deres identitet samt dato og tidspunkt for evt. død eller human aflivning

— antal dyr, der viser tegn på toksicitet, og deres identitet samt en beskrivelse af de observerede tegn på toksicitet, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhed af alle toksiske virkninger

— antal dyr, der udviser læsioner, og deres identitet samt en beskrivelse af læsionernes art.

51. Individuelle dyredata registreres med kropsvægt, vådvægt af uterus og tørvægt af uterus. Ensidede statistiske analyser for agonister anvendes til at bestemme, om indgiften af et testkemikalie har ført til en statistisk signifikant ($p < 0,05$) stigning i uterusvægt. Passende statistiske analyser udføres for at teste, om der er behandlingsrelaterede ændringer i tør- og vådvægt af uterus. F.eks. kan dataene vurderes ved en kovariansanalysemetode (ANCOVA) med kropsvægt ved obduktion som kovariablen. En variansstabiliserende logaritmisk transformation kan udføres på uterusdata forud for dataanalysen. Dunnett og Hsus test er hensigtsmæssig til at foretage parvise sammenligninger af hver dosisgruppe i forhold til vehikelkontrolgrupperne og til at beregne konfidensintervaller. Studentiserede residualplots kan bruges til at detektere mulige outliers og til at vurdere variansernes homogenitet.

Disse procedurer blev anvendt i OECD's valideringsprogram, der benytter PROC GLM i det statistiske analysesystem (SAS Institute, Cary NC), version 8 (6)(7).

52. Den endelige rapport skal indeholde:

Testlaboratorium

— ansvarligt personale og deres undersøgelsesansvar

— data fra den positive basislinjekontroltest og periodiske positive kontroldata (se pkt. 26 og 27).

Testkemikalie

— karakterisering af testkemikalier

— fysisk form og, når det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— blanding af fortyndinger: metode og frekvens

— evt. data genereret vedrørende stabilitet

— evt. analyser af testopløsninger.

Vehikel

— karakterisering af testvehikel (art, leverandør og batch)

— begrundelse for valg af vehikel (hvis andet end vand).

Forsøgsdyr

— art og stamme samt begrundelse for valget heraf

— leverandør og særlig leverandør

— alder ved levering med fødselsdato

— ved ikkekønsmodne dyr, om de er leveret med moder- eller plejedyr og dato for fravænning

— oplysninger om procedure for akklimatisering af dyr

— antal dyr pr. bur

— oplysninger om metode til individuel identifikation af dyr og grupper.

Assaybetingelser

— oplysninger om randomiseringsproces (dvs. anvendt metode)

— rationale for valg af dosis

— oplysninger om testkemikaliets formulering, opnåede koncentrationer heraf, stabilitet og homogenitet

— oplysninger om indgift af testkemikalie og rationale for valg af eksponeringsvej

— foder (navn, type, leverandør, indhold, og hvis det er kendt, fytoøstrogenniveau)

— vandkilde (f.eks. hanevand eller filtreret vand) og tilførsel (ved rør fra en stor beholder, i flasker osv.)

— strøelse (navn, type, leverandør, indhold)

— registrering af anbringelsesforhold, belysningsinterval, rumtemperatur og luftfugtighed, rengøring af rummet

— detaljeret beskrivelse af procedurer for obduktion og vejning af uterus

— beskrivelse af statistiske procedurer.

Resultater

For individuelle dyr

— vægt fra alle daglige individuelle kropsvejninger (fra fordeling i grupper til obduktion) (til nærmeste 0,1 g)

— hvert dyrs alder (i dage, idet fødselsdagen regnes som dag 0), når indgift af testkemikaliet begynder

— dato og tidspunkt for indgift af hver dosis

— beregnet volumen og dosering indgivet og observationer af evt. doseringstab under eller efter indgiften

— daglig registrering af status for dyr, herunder relevante symptomer og observationer

— mistænkt dødsårsag (hvis fundet under undersøgelsen i moribund tilstand eller død)

— dato og tidspunkt for human aflivning med tidsinterval til seneste dosering

— vådvægt af uterus (til nærmeste 0,1 mg) og evt. observationer af luminale væsketab under dissektion og forberedelse til vejning

— tørvægt af uterus (til nærmeste 0,1 mg).

For hver gruppe af dyr

— gennemsnitlig daglig kropsvægt (til nærmeste 0,1 g) og standardafvigelser (fra fordeling i grupper til obduktion)

— gennemsnitlig vådvægt af uterus og gennemsnitlig tørvægt af uterus (til nærmeste 0,1 mg) og standardafvigelser

— daglig foderindtagelse, hvis den måles (beregnet som gram foderindtagelse pr. dyr)

— resultater af statistiske analyser med sammenligning af både våd- og tørvægt af uterus for behandlede grupper i forhold til de samme målinger i vehikelkontrolgrupperne

— resultater af statistisk analyse med sammenligning af den samlede kropsvægt og kropsvægtforøgelsen i de behandlede grupper i forhold til de samme målinger i vehikelkontrolgrupperne.

53. Resumé af vigtige vejledningsoplysninger om testmetoden

	Rotte	**Mus**
Dyr		
Stamme	Stamme af almindeligt anvendte forsøgsgnavere	
Antal dyr	Minimum seks dyr pr. dosisgruppe	
Antal grupper	Minimum to testgrupper (se vejledning i pkt. 33) og en negativ kontrolgruppe Med hensyn til vejledning om positive kontrolgrupper henvises til pkt. 26 og 27.	
Miljøbetingelser og fodring		
T° i forsøgslokalet	22 °C ± 3 °C	
Relativ luftfugtighed	50-60 % og ikke under 30 % eller over 70 %	
Daglig belysningssekvens	12 timers lys, 12 timers mørke	
Foder og drikkevand	Ad libitum	

	Rotte	Mus
Anbringelse	Individuelt eller i grupper på op til tre dyr (social gruppeanbringelse anbefales for ikkekønsmodne dyr)	
Foder og strøelse	Fytoøstrogener med lavt niveau anbefales i foder og strøelse	
Protokol		
Metode	Den ikkekønsmodne, ikkeovariektomiserede metode (den foretrukne) Den ovariektomiserede metode for voksne hunner	Den ovariektomiserede metode for voksne hunner
Alder for dosering af ikkekønsmodne dyr	Tidligst PND 18. Dosering skal være afsluttet før PND 25	Ikke relevant under den aktuelle testmetodes anvendelsesområde
Alder for ovariektomi	Mellem seks og otte uger	
Alder for dosering af ovariektomiserede dyr	Der skal gå mindst 14 dage mellem ovariektomi og den første indgiftsdag.	Der skal gå mindst syv dage mellem ovariektomi og den første indgiftsdag.
Kropsvægt	Variation i kropsvægt skal være minimal og må ikke overstige ± 20 % af middelvægten.	
Dosering		
Indgiftsvej	Oral sonde eller subkutan injektion	
Indgiftsfrekvens	Én daglig dosis	
Volumen til sonde og injektion	≤ 5ml/kg kropsvægt (eller op til 10 ml/kg kropsvægt i tilfælde af vandige opløsninger) (på to injektionssteder for den subkutane vej)	
Indgiftens varighed	Tre på hinanden følgende dage for den ikkekønsmodne model Minimum tre på hinanden følgende dage for OVX-modellen	Syv på hinanden følgende dage for OVX-modellen
Obduktionstidspunkt	Ca. 24 timer efter sidste dosis	
Resultater		
Positiv respons	Statistisk signifikant stigning i den gennemsnitlige uterusvægt (våd- og/eller tørvægt)	
Referenceøstrogen	17α-ethinylestradiol	

VEJLEDNING I FORTOLKNING OG GODKENDELSE AF RESULTATER

54. Generelt skal en test for østrogenicitet betragtes som positiv, hvis der er en statistisk signifikant stigning i uterusvægt ($p < 0,05$) i det mindste ved det høje dosisniveau sammenlignet med kontrolgruppen, der kun får opløsningsmiddel. Et positivt resultat understøttes yderligere af, at der påvises en biologisk plausibel sammenhæng mellem dosis og responsens størrelsesorden, idet man skal være opmærksom på, at testkemikaliets overlappende østrogene og antiøstrogene aktiviteter kan påvirke dosis-responskurvens form.

55. Man skal passe på ikke at overskride den maksimalt tolererede dosis for at sikre en meningsfuld fortolkning af data. Reduktion af kropsvægt, kliniske tegn og andre fund vurderes grundigt i den forbindelse.

56. En vigtig overvejelse ved godkendelse af data fra det uterotrofiske bioassay er uterusvægten hos vehikelkontrolgruppen. Høje kontrolværdier kan skade bioassayets responsivitet og evne til at detektere meget svage østrogenagonister. Litteraturgennemgang og data genereret under valideringen af det uterotrofiske bioassay tyder på, at tilfælde af høje kontrolgennemsnit faktisk forekommer spontant, især hos ikkekønsmodne dyr (2)(3)(6)(9). Da uterusvægten hos ikkekønsmodne rotter afhænger af mange variabler såsom stamme eller kropsvægt, kan der ikke sættes nogen endelig øvre grænse for uterusvægten. Som vejledning kan det siges, at hvis tørvægten af uterus hos ikkekønsmodne kontrolrotter ligger mellem 40 og 45 mg, skal resultaterne betragtes som mistænkelige, og en uterusvægt på over 45 mg kan betyde, at testen skal gennemføres igen. Dette skal dog overvejes i hvert enkelt tilfælde (3)(6)(8). Ved forsøg med voksne rotter vil en ufuldstændig ovariektomi efterlade ovarievæv, som kan producere endogent østrogen og forsinke nedgangen i uterusvægt.

57. Vehikelkontrol med tørvægt af uterus under 0,09 % kropsvægt for ikkekønsmodne hunrotter og under 0,04 % for ovariektomiserede unge voksne hunner ser ud til at give acceptable resultater [se tabel 31 (2)]. Hvis kontroluterusvægten er større end disse tal, skal forskellige faktorer undersøges, bl.a. dyrenes alder, korrekt ovariektomi, fytoøstrogener i foderet osv., og et negativt assayresultat (ingen tegn på østrogen aktivitet) skal anvendes med forsigtighed.

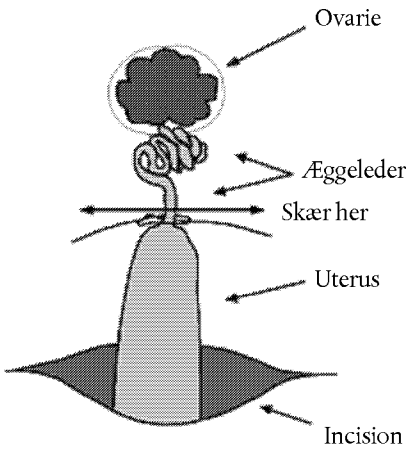
58. Tidligere data for vehikelkontrolgrupperne opbevares i laboratoriet. Tidligere data for reaktioner på positive referenceøstrogener såsom 17a-ethinylestradiol opbevares også på laboratoriet. Laboratorierne kan også teste responsen på kendte svage østrogenagonister. Alle disse data kan sammenlignes med tilgængelige data (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) for at sikre, at laboratoriets metoder giver tilstrækkelig følsomhed.

59. Tørvægten af uterus viste mindre variabilitet i løbet af OECD's valideringsundersøgelse end vådvægten af uterus (6)(7). Imidlertid vil en signifikant respons i hver måling vise, at testkemikaliet er positivt over for østrogenaktivitet.

60. Den uterotrofiske respons skyldes ikke udelukkende østrogen, men et positivt resultat af bioassayet skal normalt fortolkes som bevis for østrogent potentiale in vivo og skal normalt give anledning til foranstaltninger med henblik på yderligere afklaring (se pkt. 9 og »OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals«, bilag 2).

Figur 1

Skematisk diagram, der viser den kirurgiske fjernelse af ovarier



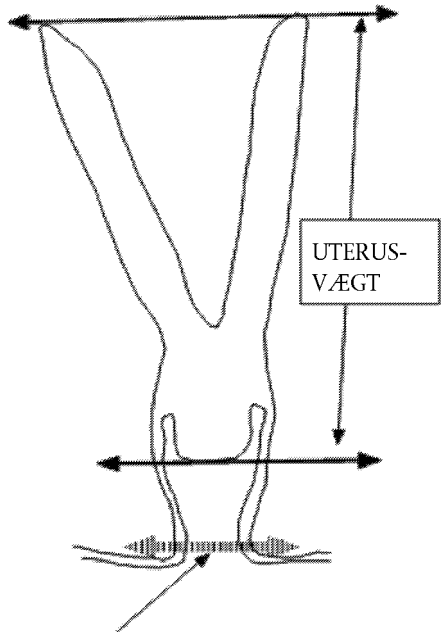
Mesometrium, blodkar og fedtpuder ikke vist

Proceduren begynder ved at åbne den dorsolaterale abdominalvæg ved midtpunktet mellem ribbenenes margo inferior og crista iliaca og nogle få millimeter lateralt i forhold til lændemusklens laterale kant. Ovarierne lokaliseres i bughulen. På et aseptisk felt fjernes ovarierne herefter fysisk fra bughulen, idet der lægges en ligatur mellem

ovarie og uterus for at kontrollere blødning, og ovariet frigøres ved incision over ligaturen ved forbindelsespunktet mellem æggeleder og hvert livmoderhorn. Efter bekræftelse af, at der ikke forekommer væsentlig blødning, lukkes abdominalvæggen med sutur, og huden lukkes, f.eks. med autoclips eller sutur. Dyrene skal have mulighed for at komme sig, og uterusvægten for at gå ned i mindst 14 dage før brug.

Figur 2

Fjernelse og præparering af uterusvæv til vægtmåling



Proceduren begynder ved at åbne abdominalvæggen ved skambenssymfysen. Herefter frigøres evt. ovarier samt livmoderhorn fra den dorsale abdominalvæg. Urinblære og urinledere fjernes fra den ventrale og laterale side af uterus og vagina. Fibrøs adhæsion mellem rektum og vagina frigøres, til forbindelsespunktet mellem vaginalåbning og perinealhud kan identificeres. Uterus og vagina frigøres fra kroppen ved foretage en incision i vaginalvæggen lige over forbindelsespunktet i perinealhuden som vist på figuren. Uterus frigøres fra kropsvæggen ved forsigtigt at skære det uterine mesenterium dorsolateralt ved tilhæftningspunktet i hele længden af hvert livmoderhorn. Efter fjernelse fra kroppen renses overskydende fedt og bindevæv væk. Evt. ovarier fjernes ved æggelederen, idet tab af luminalvæske fra livmoderhornet undgås. Såfremt dyret er blevet ovariektomiseret, undersøges ovariestilkene for tilstedeværelse af evt. ovarievæv. Vagina fjernes fra uterus lige under cervix, således at cervix forbliver sammen med corpus uteri som vist på figuren. Uterus kan herefter vejes.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Antiøstrogenicitet er et kemikalies evne til at undertrykke virkningen af estradiol 17ß i et pattedyrs organisme.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Fødselsdato er dag 0 efter fødslen (PND).

Dosering er en generel term, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Dosis er mængden af indgivet testkemikalie. For det uterotrofiske bioassay udtrykkes dosis som vægt af et testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets kropsvægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag).

Maksimalt tolereret dosis (MTD) er den højeste mængde af et kemikalie, som ikke dræber forsøgsdyrene, når det indgives i kroppen (betegnes LD_0) (IUPAC, 1993).

Østrogenicitet er et kemikalies evne til at fungere som estradiol 17ß i et pattedyrs organisme.

Postnatal dag X er den X. levedag efter fødselsdagen (PND).

Følsomhed er andelen af alle positive/aktive kemikalier, som klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en testmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en testmetodes relevans.

Specificitet er andelen af alle negative/inaktive kemikalier, som klassificeres korrekt ved testen. Det er et mål for nøjagtigheden af en testmetode, som giver kategoriske resultater, og er et vigtigt kriterium ved vurderingen af en testmetodes relevans.

Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

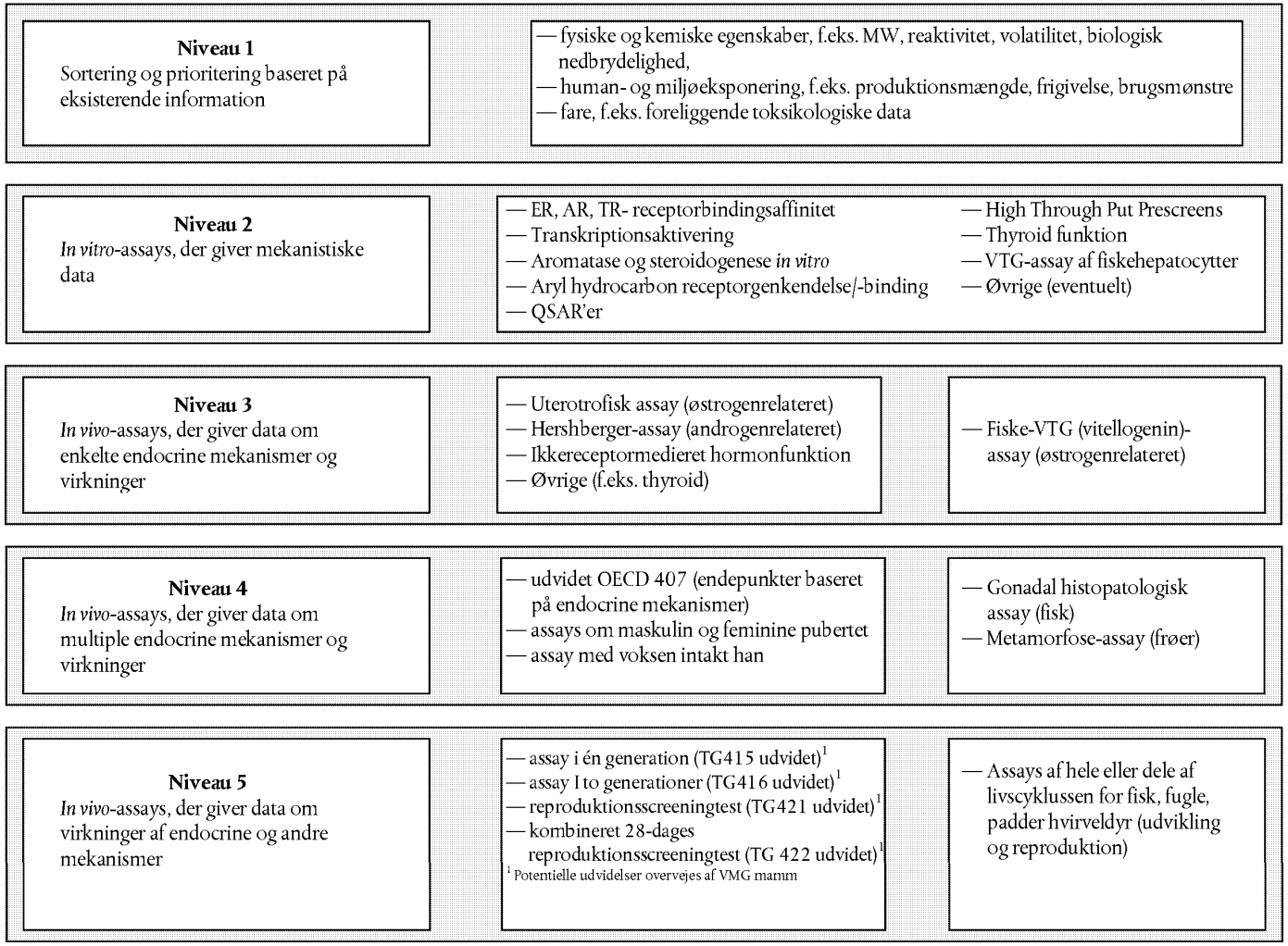
Uterotrofisk er en term, der bruges til at beskrive en positiv påvirkning af væksten af uterine væv.

Validering er en videnskabelig proces til at karakterisere en testmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvise dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

Tillæg 2

Note: Dokument udarbejdet af sekretariatet for testvejledningsprogrammet baseret på den aftale, der blev indgået på det sjette møde i EDTA-taskforcen

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

NOTER TIL RAMMEN

Note 1: Det er muligt at gå ind og ud på alle niveauer; afhænger af arten af eksisterende informationsbehov med henblik på fare- og risikovurdering.

Note 2: På niveau 5 skal økotoksikologi omfatte endepunkter, der viser skadelige virkningsmekanismer og potential skade på befolkningen.

Note 3: Når en multimodal model dækker flere single endpoint assays, vil modellen erstatte brugen af de pågældende single endpoint assays.

Note 4: Vurderingen af hvert kemikalie skal ske i hvert enkelt tilfælde under inddragelse af al tilgængelig information og under hensyntagen til rammeniveauernes funktion.

Note 5: Rammen omfatter ikke alt på det givne tidspunkt. På niveau 3, 4 og 5 omfatter den assays, der enten er tilgængelige, eller hvor valideringen er på vej. Med hensyn til sidstnævnte er disse foreløbigt inkluderet. Når de er udviklet og valideret, vil de blive formelt tilføjet til rammen.

Note 6: Niveau 5 omfatter ikke kun endelige test. Test inkluderet på dét niveau bidrager til generel fare- og risikovurdering.

LITTERATUR

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.-11. marts 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549

8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.

9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [I^{125}]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985) The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.

14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.

15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on in vivo responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec. 106:369-373.

16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002) Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145-157.

18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the kovarians changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613-620.

20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477-485.

21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol. 20:343-347.

22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381-393.

23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci. 37:596-601.

24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320-333.

28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33-41.

29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288-305.

30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284-291.

31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.

33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

38) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

B.55. **HERSHBERGER-TESTEN I ROTTER: EN KORTTIDSSCREENINGTEST FOR (ANTI)ANDROGENE EGENSKABER**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 441 (2009). OECD indledte en højt prioriteret aktivitet i 1998 med at revidere eksisterende vejledninger og udvikle nye vejledninger for screening og test af potentielt hormonforstyrrende stoffer (1). Et element i denne aktivitet var at udvikle en testvejledning for Hershberger-bioassayet med rotter. Dette assay blev først i 1962 standardiseret af et officielt ekspertudvalg som screeningværktøj for androgene kemikalier (2), efter at lægemiddelindustrien havde brugt det i flere årtier. I 2001-2007 gennemgik Hershberger-bioassayet med rotter et omfattende valideringsprogram, herunder udarbejdelse af et Background Review Document (23), udarbejdelse af et detaljeret dokument om metoder (3), udvikling af en dissektionsvejledning (21) og gennemførelse af omfattende intra- og interlaboratorieundersøgelser for at vise bioassayets pålidelighed og reproducerbarhed. Disse valideringsundersøgelser blev foretaget med et potent referenceandrogen (testosteron propionat (TP)), to potente syntetiske androgener (trenbolonacetat og methyltestosteron), et potent antiandrogent lægemiddel (flutamid), en potent syntesehæmmer (finasterid) af det naturlige androgen (dihydrotestosteron-DHT), flere ugentlige antiandrogene pesticider (linuron, vinclozolin, procymidon, p,p»DDE«), en potent 5α reduktasehæmmer (finasterid) og to kendte negative kemikalier (dinitrophenol og nonylphenol) (4) (5) (6) (7) (8). Denne testmetode er resultatet af de årelange erfaringer med bioassayet og erfaringerne fra valideringstestprogrammet og de der opnåede resultater.

2. Hershberger-bioassayet er en korttidsscreeningtest in vivo under anvendelse af sekundært væv fra hannens forplantningssystem. Assayet havde sin oprindelse i 1930'erne og blev ændret i 1940'erne, så det kom til at omfatte androgenresponsive muskler i hannens forplantningssystem (2) (9-15). I 1960'erne blev over 700 mulige androgener evalueret ved hjælp af en standardiseret version af protokollen (2) (14), og anvendelsen af assayet til både androgener og antiandrogener blev betragtet som en standardmetode i 1960'erne (2) (15). Det aktuelle bioassay er baseret på vægtændringerne i fem androgenafhængige væv hos den kastrerede peripubertære hanrotte. I bioassayet evalueres et kemikalies evne til at fremkalde biologiske virkninger i overensstemmelse med androgene agonister, antagonister eller 5α-reduktasehæmmere. De fem androgenafhængige målvæv, der er omfattet af denne testmetode, er ventral prostata (VP), vesiculae seminales (SV) (plus væsker og prostata anterior (coagulating glands)), levator ani-bulbocavernosus-musklen (LABC), parrede Cowpers kirtler (COW) og glans penis (GP). Hos kastrerede peripubertære hanrotter reagerer disse fem væv alle på androgener med en stigning i absolut vægt. Når de samme væv stimuleres til at øge vægten gennem indgift af et potent referenceandrogen, reagerer alle fem væv på antiandrogener med et fald i absolut vægt. Den primære model for Hershberger-bioassayet har været den kirurgisk kastrerede peripubertære han, som blev valideret i fase 1, 2 og 3 i Hershberger-valideringsprogrammet.

3. Hershberger-bioassayet fungerer som et mekanistisk in vivo-screeningassay for androgenagonister, androgenantagonister og 5a-reduktasehæmmere, og anvendelsen heraf skal ses i forbindelse med »OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« (tillæg 2). I denne konceptramme ligger Hershberger-bioassayet på niveau 3 som et in vivo-assay, der giver data om en enkelt endokrin mekanisme, nemlig (anti)androgenicitet. Det skal indgå i en række in vitro- og in vivo-test med henblik på at afdække kemikalier med potentiale til at interagere med det endokrine system, så man i sidste ende kan foretage vurderinger af farer og risici for menneskers sundhed og miljøet.

4. Af hensyn til dyrevelfærden i forbindelse med kastrationsproceduren ønskede man den intakte (ukastrerede), stimulerede og fravænnede han som en alternativ model til Hershberger-bioassayet for at undgå kastration. Testmetoden med stimulerede fravænnede dyr blev valideret (24). Ved valideringsundersøgelserne så udgaven af Hershberger-bioassayet med fravænnede dyr dog ikke ud til konsekvent at kunne detektere virkninger på androgenafhængige organers vægt af svage antiandrogener ved de testede doser. Derfor blev det ikke inkluderet i denne testmetode. I anerkendelse af at anvendelsen heraf ikke blot kan give fordele for dyrevelfærden, men også kan give information om andre virkningsmåder, er det tilgængeligt i OECD's vejledning 115 (25).

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

5. Androgenagonister og -antagonister fungerer som ligander for androgenreceptoren og kan henholdsvis aktivere eller hæmme receptorkontrolleret gentranskription. Endvidere hæmmer nogle kemikalier omdannelsen af testosteron til mere potent naturlig androgen dihydrotestosteron i nogle androgene målvæv (5a-reduktasehæmmere). Disse kemikalier kan potentielt føre til sundhedsrisici, herunder skadevirkninger for reproduktion og udvikling. Derfor er der et lovgivningsmæssigt behov for hurtigt at vurdere og evaluere et kemikalie som en mulig androgenagonist eller -antagonist eller 5a-reduktasehæmmer. Selv om en ligands affinitet for en androgenreceptor som målt ved receptorbinding eller transkriptionsaktivering af reportergener in vitro er informativ, er det ikke den eneste determinant for mulig fare. Andre determinanter omfatter metabolisk aktivering og deaktivering ved optagelse i kroppen, kemikaliefordeling til målvæv og clearance fra kroppen. Dette skaber behov for at screene et kemikalies mulige aktivitet in vivo under relevante betingelser og relevant eksponering. In vivo-evaluering er mindre kritisk, hvis kemikaliets kendetegn med hensyn til absorption, distribution, metabolisme og eliminering (ADME) er kendt. Androgenafhængige væv reagerer med hurtig og kraftig vækst på stimulering med androgener, især hos kastrerede peripubertære hanrotter. Gnaverarter, navnlig rotten, anvendes også bredt i toksicitetsundersøgelser til risikobeskrivelse. Derfor er den assayversion, som anvender kastrerede peripubertære rotter og de fem målvæv i dette assay, egnet til in vivo-screening af androgenagonister og -antagonister og 5a-reduktasehæmmere.

6. Denne testmetode er baseret på de protokoller, der blev anvendt i OECD's valideringsundersøgelse, og som har vist sig at være pålidelige og repeterbare i intra- og interlaboratorieundersøgelser (4) (5) (6) (7) (8). Både androgene og antiandrogene procedurer præsenteres i denne testmetode.

7. Selv om der var en vis variation i den TP-dose, de forskellige laboratorier brugte til at detektere antiandrogener i OECD's valideringsprogram for Hershberger-bioassay (0,2 mod 0,4 mg/kg/dag, subkutan injektion), var der kun en lille forskel mellem disse to protokolvariationer i evnen til at detektere svag eller stærk antiandrogen aktivitet. Det er dog klart, at TP-dosen ikke skal være så høj, at den blokerer virkningerne af svage androgenreceptorantagonister (AR), eller så lav, at de androgene væv kun udviser en lille vækstrespons selv uden samtidig indgift af antiandrogen.

8. Vækstresponsen i de enkelte androgenafhængige væv skyldes ikke udelukkende androgen, hvilket vil sige, at andre kemikalier end androgenagonister kan ændre vægten af visse væv. Dog underbygger vækstresponsen i flere væv samtidig en mere androgenspecifik mekanisme. F.eks. kan høje doser af potent østrogen øge vægten af vesiculae seminales. Dog reagerer de øvrige androgenafhængige væv i assayet ikke på samme måde. Antiandrogene kemikalier kan fungere som enten androgenreceptorantagonister eller 5a-reduktasehæmmere. 5a-reduktasehæmmere har variabel virkning, fordi omdannelsen til mere potent dihydrotestosteron varierer efter væv. Antiandrogener, som hæmmer 5α-reduktase, såsom finasterid har mere udtalte virkninger i ventral prostata end andre væv sammenlignet med en potent AR-antagonist som flutamid. Denne forskel i vævsrespons kan bruges til at differentiere mellem AR-medierede og 5α-reduktasemedierede virkningsmåder. Desuden hænger den androgene receptor udviklingsmæssigt sammen med andre steroidhormoner, og visse andre hormoner kan — når de indgives ved høje suprafysiologiske doseringsniveauer — binde og antagonisere de vækstfremmende virkninger af TP (13). Endvidere er det også plausibelt, at styrket steroidmetabolisme og en konsekvent sænkning af serumtestosteron kan reducere androgenafhængig vævsvækst. Derfor skal et positivt udfald i Hershberger-bioassayet normalt evalueres efter en såkaldt »weight of evidence«-tilgang, bl.a. in vitro-assays, f.eks. assays om AR- og østrogenreceptorbinding (ER) og tilsvarende assays om transkriptionsaktivering eller andre in vivo-assays, der undersøger lignende androgene målvæv, såsom assayet om hannens pubertet, 15-dages assay af voksen han eller 28- eller 90-dagesundersøgelser med gentagen dosis.

9. Erfaringerne viser, at xenobiotiske androgener er sjældnere end xenobiotiske antiandrogener. Forventningen er, at Hershberger-bioassayet oftest vil blive anvendt til screening af antiandrogener. Imidlertid kan proceduren for at teste for androgener ikke desto mindre anbefales for steroide eller steroidlignende kemikalier eller for kemikalier, for hvilke et tegn på mulige androgene virkninger blev afledt af metoder indeholdt i konceptrammens niveau 1 eller 2 (tillæg 2). På samme måde kan der observeres skadevirkninger i forbindelse med (anti)androgene profiler i niveau 5-assays, hvilket skaber behov for at vurdere, om et kemikalie har en endokrin virkningsmåde.

10. Det er anerkendt, at alle dyrebaserede procedurer skal overholde lokale standarder for pasning af dyr. Nedenstående beskrivelser af pleje og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (26). OECD har udarbejdet yderligere vejledning om human behandling af dyr (17).

11. Som i ethvert bioassay, hvor der benyttes forsøgsdyr, skal det nøje overvejes, om det er nødvendigt at udføre den pågældende undersøgelse. Grundlæggende kan der være to grunde til en sådan beslutning:

— højt eksponeringspotentiale (niveau 1 i konceptrammen) eller tegn på (anti)androgenicitet i in vitro-assays (niveau 2) til støtte for undersøgelser af, om sådanne virkninger kan optræde in vivo

— virkninger i overensstemmelse med (anti)androgenicitet i in vivo-test på niveau 4 eller 5 til støtte for undersøgelser af den specifikke virkningsmåde, f.eks. for at fastslå, om virkningerne skyldtes en (anti)androgen mekanisme.

12. Definitioner anvendt i denne testmetode er anført i tillæg 1.

PRINCIP FOR TESTEN

13. Hershberger-bioassayet opnår sin følsomhed ved at anvende hanner med en minimal endogen androgenproduktion. Dette opnås ved at anvende kastrerede hanner, forudsat at der gives en passende tid efter kastration, så målvævene kan vende tilbage til en minimal og ensartet basislinjevægt. Ved screening af potentiel androgen aktivitet er der således lave endogene niveauer af cirkulerende androgener, HPG-aksen (hypotalamus-hypofyse-gonade) gøres ude af stand til at kompensere via feedbackmekanismer, vævenes evne til at reagere maksimeres, og variabiliteten i vævets udgangsvægt minimeres. Ved screening af potentiel antiandrogen aktivitet kan der opnås en mere konsistent vævsvægtforøgelse, når vævene stimuleres af et referenceandrogen. Som følge heraf kræver Hershberger-bioassayet kun seks dyr pr. dosisgruppe, mens det til andre assays med intakte pubertære eller voksne hanner foreslås at anvende 15 hanner pr. dosisgruppe.

14. Peripubertære hanner kastreres på passende vis under anvendelse af godkendte bedøvelsesmidler og aseptisk teknik. Smertestillende midler indgives i de første dage efter operation for at fjerne gener efter indgrebet. Kastration øger assayets præcision med hensyn til at detektere svage androgener og antiandrogener ved at fjerne kompenserende endokrine feedbackmekanismer, som er til stede i det intakte dyr, og som kan mildne virkningerne af indgivne androgener og antiandrogener, og ved at fjerne den store variation i serumtestosteronniveauer mellem individerne. Derfor mindsker kastration antallet af dyr, som det er nødvendigt at screene for disse endokrine aktiviteter.

15. Ved screening for potentiel androgen aktivitet indgives testkemikaliet dagligt ved oral sonde eller subkutan injektion i en periode på 10 på hinanden følgende dage. Testkemikalier indgives til minimum to behandlingsgrupper af forsøgsdyr med ét dosisniveau pr. gruppe. Dyrene obduceres ca. 24 timer efter den sidste dosis. En statistisk signifikant stigning i vægten af to eller flere målorganer hos testkemikaliegrupperne sammenlignet med vehikelkontrolgruppen viser, at testkemikaliet er positivt for potentiel androgen aktivitet (se pkt. 60). Androgener som trenbolon, der ikke kan være 5α-reduceret, har mere udtalte virkninger på LABC og GP over for TP, men alle væv skal udvise øget vægt.

16. Ved screening for potentiel antiandrogen aktivitet indgives testkemikaliet dagligt ved oral sonde eller subkutan injektion i en periode på 10 på hinanden følgende dage sammen med daglige TP-doser (0,2 eller 0,4 mg/kg/dag) ved subkutan injektion. Det blev fastslået i valideringsprogrammet, at enten 0,2 eller 0,4 mg TP/kg/dag kunne

bruges, da begge var effektive til detektion af antiandrogener, og derfor skal kun én dosis vælges til brug i assayet. Graduerede testkemikaliedoser indgives til minimum tre behandlingsgrupper af forsøgsdyr med ét dosisniveau pr. gruppe. Dyrene obduceres ca. 24 timer efter den sidste dosis. Et statistisk signifikant fald i vægten af to eller flere målorganer hos de grupper, der får testkemikaliet plus TP, sammenlignet med kontrolgruppen, der kun får TP, viser, at testkemikaliet er positivt for potentiel antiandrogen aktivitet (se pkt. 61).

BESKRIVELSE AF METODEN

Valg af art og stamme

17. Rotten er rutinemæssigt blevet anvendt i Hershberger-bioassays siden 1930'erne. Skønt det er biologisk plausibelt, at både rotter og mus vil udvise de samme reaktioner, er rotter den foretrukne art til Hershberger-bioassayet på grundlag af 70 års erfaring med rottemodellen. Da Hershberger-bioassaydata desuden måske er foreløbige forud for en langtidsundersøgelse af flere generationer, giver det mulighed for, at dyr fra den samme art, stamme og kilde kan anvendes i begge undersøgelser.

18. Denne protokol giver laboratorier mulighed for at udvælge den rottestamme, der skal anvendes i assayet, og som normalt skal være den, det deltagende laboratorium tidligere har brugt. Almindeligt anvendte forsøgsrottestammer kan anvendes. Dog skal stammer, der bliver kønsmodne betydeligt senere end ved 42-dages alderen, ikke anvendes, da kastration af disse hanner, når de er 42 dage, kan udelukke måling af vægten af glans penis, hvilket først kan ske, efter at forhuden er adskilt fra penisskaftet. Således bør stammer afledt af Fisher 344-rotten kun anvendes i sjældne tilfælde. Fisher 344-rotten bliver kønsmoden på et andet tidspunkt end andre mere almindeligt anvendte stammer såsom Sprague Dawley- eller Wistar-stammerne (16). Skal en sådan stamme anvendes, skal laboratoriet kastrere dem, når de er lidt ældre, og påvise den anvendte stammes følsomhed. Rationalet bag valget af rottestamme skal klart angives af laboratoriet. Hvis screeningassayet kan gennemføres som en forundersøgelse til en undersøgelse med gentagen oral dosis, en reproduktions- og udviklingsundersøgelse eller en langtidsundersøgelse, skal der helst bruges dyr fra samme stamme og kilde i alle undersøgelser.

Miljøbetingelser og fodring

19. Alle procedurer skal overholde alle lokale standarder for pasning af forsøgsdyr. Disse beskrivelser af pasning og behandling er minimumsstandarder og vil blive erstattet af strengere lokale forskrifter såsom Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (26). Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være mindst 30 % og helst ikke over 70 % bortset fra under rengøring af rummet, men 50-60 % bør tilstræbes. Belysningen skal være kunstig bestående af 12 timers lys og 12 timers mørke.

20. På grund af dyrenes unge alder og den kendsgerning, at rotter er sociale dyr, foretrækkes gruppeanbringelse frem for isolering. Når man anbringer to eller tre dyr pr. bur, undgår man sammenklumpning og dermed forbundet stress, som kan forstyrre den hormonale kontrol med udviklingen af sekundært kønsvæv. Burene renses grundigt for at fjerne mulige forurenende stoffer og anbringes således, at mulige virkninger som følge af burenes placering minimeres. Bure af korrekt størrelse (~ 2 000 cm^2) vil forhindre sammenklumpning.

21. Hvert dyr identificeres individuelt (f.eks. øremærke eller tag) under anvendelse af en human metode. Identifikationsmetoden registreres.

22. Laboratoriefoder og drikkevand gives ad libitum. Laboratorier, der udfører Hershberger-bioassays, skal bruge det laboratoriefoder, som normalt bruges i deres kemiske testarbejde. I valideringsundersøgelserne af bioassayet blev der ikke observeret virkninger eller variabilitet, som skyldtes kosten. Foderet registreres normalt, og en prøve på laboratoriefoderet opbevares til evt. fremtidig analyse.

Resultatkrav til androgenafhængig organvægt

23. Under valideringsundersøgelsen var der intet bevis for, at et fald i kropsvægt påvirkede stigninger eller fald i væksten i målvævenes vægt (dvs. væv, som skulle vejes i den pågældende undersøgelse).

24. Blandt de forskellige rottestammer, som med held blev anvendt i valideringsprogrammet, er den androgenafhængige organvægt større hos de tungere rottestammer end hos de lettere. Derfor omfatter resultatkravene til Hershberger-bioassayet ikke absolut forventede organvægtværdier for positive og negative kontroller.

25. Fordi variationskoefficienten for et væv har en omvendt sammenhæng med statistisk opløsningsgrad, er ydeevnekriterierne for Hershberger-bioassayet baseret på maksimale variationskoefficienter for hvert væv (tabel 1). Variationskoefficienterne er afledt af OECD's valideringsundersøgelser. I tilfælde af negative resultater undersøger laboratorierne variationskoefficienterne fra kontrolgruppen og højdosisbehandlingsgruppen for at fastslå, om performance-kriteriet om maksimal variationskoefficient er overskredet.

26. Undersøgelsen gentages, når: 1) tre eller flere af de 10 mulige individuelle variationskoefficienter i kontrol- og højdosisbehandlingsgrupperne overskrider de fastsatte maksimumsværdier for agonist- og antagonistundersøgelser i tabel 1, og 2) mindst to målvæv var marginalt ubetydelige, dvs. r-værdier mellem 0,05 og 0,10.

Tabel 1

Maksimalt tilladelige variationskoefficienter bestemt for sekundære målkønsvæv for kastratmodellen i OECD's valideringsundersøgelser ([1])**.**

Væv	Antiandrogene virkninger	Androgene virkninger
Vesiculae seminales	40 %	40 %
Ventral prostata	40 %	45 %
LABC	20 %	30 %
Cowpers kirtler	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

FREMGANGSMÅDE

Overholdelse af lovgivning og laboratoriekontrol

27. I modsætning til det uterotrofiske assay (kapitel B.54 i dette bilag) er en påvisning af laboratoriets kompetence før iværksættelse af undersøgelsen ikke nødvendig ved Hershberger-assayet, fordi der som en integreret del af assayet samtidig foretages positive (testosteronpropionat og flutamid) og negative kontroller.

Dyrenes antal og vilkår

28. Hver test- og kontrolgruppe skal omfatte minimum seks dyr. Dette gælder for både androgene og antiandrogene protokoller.

Kastration

29. Der skal være en indledende akklimatiseringsperiode på flere dage efter modtagelse af dyrene for at sikre, at dyrene er sunde og trives. Da dyr, som er kastreret, før de er 42 dage gamle eller før PND 42, måske ikke viser tegn på præputial separation, skal dyrene kastreres på PND 42 eller senere, ikke før. Dyrene kastreres under bedøvelse ved at lægge et indsnit i scrotum og fjerne både testes og epididymides med ligering af blodkar og sædgange. Efter bekræftelse af, at der ikke er opstået blødning, lukkes scrotum med sutur eller autoclips. Dyrene behandles med smertestillende midler i de første par dage efter operationen for at mildne evt. gener efter indgrebet. Købes kastrerede dyr fra en dyreleverandør, skal leverandøren garantere dyrenes alder og status for kønsmodning.

([1]) Tærskelvariationskoefficienten for et givet væv blev identificeret fra en graf af variationskoefficientværdier — anført fra sekventielt mindste til største — for alle gennemsnit fra alle forsøg i valideringsundersøgelsen under anvendelse af en bestemt model (agonist eller antagonist). Tærskelvariationskoefficienten blev læst fra det punkt, hvor intervallerne mellem de næsthøjeste variationskoefficienter i serien er dramatisk større end de foregående få variationskoefficienter — »brudpunktet«. Det skal bemærkes, at skønt denne analyse identificerede relativt pålidelige »brudpunkter« for assayets antagonistmodel, viste variationskoefficientkurver for agonistassayet en mere ensartet stigning, hvilket gør identificeringen af en tærskelvariationskoefficient noget tilfældig efter denne metode.

Akklimatisering efter kastration

30. Dyrene fortsætter akklimatiseringen til laboratorieforholdene for at give vægten af målvævet tid til at falde i mindst syv dage efter kastration. Dyrene observeres dagligt, og dyr med tegn på sygdom eller fysiske abnormiteter fjernes. Således kan behandling med iværksættelse af dosering (som undersøges) påbegyndes allerede på PND 49, men senest på PND 60. Alderen ved obduktion bør ikke være mere end PND 70. Denne fleksibilitet giver et laboratorium mulighed for at planlægge forsøgsarbejdet effektivt.

Kropsvægt og grupperandomisering

31. Forskellene i individuel kropsvægt er en kilde til variabilitet i vævsvægt både inden for og imellem grupper af dyr. Stigende variabilitet i vævsvægt resulterer i en øget variationskoefficient og nedsætter assayets statistiske styrke (undertiden omtalt som assayets følsomhed). Derfor kontrolleres variationer i kropsvægt både eksperimentelt og statistisk.

32. Eksperimentel kontrol betyder, at der produceres små variationer i kropsvægt i og mellem undersøgelsesgrupperne. For det første må usædvanligt små eller store dyr undgås og må ikke placeres i en undersøgelseskohorte. Ved undersøgelsens start bør dyrenes vægtvariation ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten (f.eks. 175 g ± 35 g for kastrerede peripubertære rotter). For det andet tilordnes dyr til grupper (kontrol- og behandlingsgrupper) ved randomiseret vægtfordeling, således at hver gruppes gennemsnitlige kropsvægt ikke er statistisk forskellig fra en anden gruppes. Den anvendte blokrandomiseringsprocedure registreres.

33. Da toksicitet kan nedsætte de behandlede gruppers kropsvægt i forhold til kontrolgruppens, kan kropsvægten på den første dags indgift af testkemikaliet bruges som statistisk kovarians, ikke kropsvægten ved obduktion.

Dosering

34. Til at fastslå, om et testkemikalie kan have androgen virkning in vivo, er to dosisgrupper for testkemikaliet plus positive og vehikel- (negative) kontrolgrupper (se pkt. 43) normalt tilstrækkelige, og dette design foretrækkes derfor af hensyn til dyrevelfærden. Hvis formålet er enten at opnå en dosisresponskurve eller at ekstrapolere til lavere doser, er der behov for mindst tre dosisgrupper. Hvis der kræves information ud over identificeringen af androgen aktivitet (såsom et skøn over styrke), må man overveje et andet dosisregime. For at teste for antiandrogener indgives testkemikaliet sammen med en referenceandrogenagonist. Der skal således bruges mindst tre testgrupper med forskellige doser af testkemikaliet og en positiv og en negativ kontrolgruppe (se pkt. 44). Med undtagelse af behandling med testkemikaliet behandles dyr i kontrolgruppen på samme måde som testgruppens dyr. Hvis der anvendes et vehikel til indgift af testkemikaliet, skal kontrolgruppen modtage vehiklet i den højeste mængde, der bruges til testgrupperne.

35. Alle dosisniveauer foreslås og vælges under hensyntagen til evt. eksisterende toksicitets- og (toksiko-)kinetiske data om testkemikaliet eller materiale i den forbindelse. Ved det højeste dosisniveau tages der for det første hensyn til LD_{50} og/eller information om akut toksicitet for at undgå død, alvorlig lidelse eller gener for dyrene (17) (18) (19) (20) og for det andet til tilgængelige oplysninger om doser anvendt i subkroniske og kroniske undersøgelser. Generelt må den højeste dosis ikke forårsage en reduktion i dyrenes endelige kropsvægt på mere end 10 % af kontrolvægten. Den højeste dosis skal være enten 1) den højeste dosis, som sikrer dyrets overlevelse, og som er uden væsentlig toksicitet eller gener for dyrene efter 10 på hinanden følgende dages indgift af op til en maksimal dosis på 1 000 mg/kg/dag (se pkt. 36), eller 2) en dosis, der fremkalder (anti)androgene virkninger, alt efter hvilken der er lavest. Til screening er store intervaller, f.eks. enheder a en halv logaritme (svarende til en dosisprogression på 3,2) eller enheder a en logaritme mellem doseringerne, acceptable. Foreligger der ikke passende data, kan der udføres en range-finding-undersøgelse (se pkt. 37) til bestemmelse af de doser, der skal anvendes.

Grænsedosis

36. Såfremt en test med en grænsedosis på 1 000 mg/kg kropsvægt/dag og en lavere dosis ved anvendelse af procedurerne for denne undersøgelse ikke fremkalder en statistisk signifikant ændring i kønsorganernes vægt, kan supplerende dosisniveauer anses for unødvendige. Grænsedosis gælder, medmindre data om human eksponering viser, at der er behov for anvendelse af et højere dosisniveau.

Overvejelser over »range-finding«

37. Om nødvendigt kan der udføres en foreløbig range-finding-undersøgelse med fem dyr for at vælge de egnede dosisgrupper [ved hjælp af metoder til bestemmelse af akut giftighed (kapitel B.1.A, B.1.B i dette bilag (27), OECD-testvejledning 425 (19))]. Formålet med Hershberger-bioassayet er at vælge doser, der sikrer dyrenes overlevelse, og som er uden væsentlig toksicitet eller gener for dyrene efter 10 på hinanden følgende dages indgift af kemikaliet indtil en grænsedosis på 1 000 mg/kg/dag som anført i pkt. 35 og 36. I den forbindelse kan OECD's vejledning (17) bruges til at definere kliniske tegn på toksicitet eller lidelse for dyrene. Såfremt det er muligt inden for denne range-finding-undersøgelse, kan målvævene eksciseres efter 10 dages indgift og vejes ca. 24 timer efter indgift af den sidste dosis. Disse data kan herefter bruges som input til valg af doser i hovedundersøgelsen.

Referencekemikalier og vehikel

38. Referenceandrogenagonisten skal være testosteronpropionat (TP), CAS-nr. 57-82-5. Reference-TP-doseringen kan være enten 0,2 mg/kg kropsvægt/dag eller 0,4 mg/kg kropsvægt/dag. Referenceandrogenantagonisten skal være flutamid (FT), CAS-nr. 1311-84-7. Reference-FT-doseringen skal være 3 mg/kg kropsvægt/dag, og FT indgives sammen med reference-TP-doseringen.

39. Det anbefales først at overveje en vandig opløsning/suspension, hvor det er muligt. Da mange androgene ligander eller deres metaboliske prækursorer imidlertid normalt er hydrofobe, er den mest almindelige fremgangsmåde at anvende en opløsning/suspension i olie (f.eks. majs-, jordnødde-, sesam- eller olivenolie). Testkemikalier kan opløses i en minimal mængde på 95 % ethanol eller andre egnede opløsningsmidler og fortyndes til endelige arbejdskoncentrationer i testvehiklet. Opløsningsmidlets toksiske karakteristika skal være kendt og bør testes i en særskilt kontrolgruppe, som kun får opløsningsmiddel. Hvis testkemikaliet anses for stabilt, kan svag opvarmning og kraftig mekanisk påvirkning bruges til at fremme opløsningen af testkemikaliet. Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes. Er testkemikaliet stabilt, mens undersøgelsen står på, kan en startalikvot af testkemikaliet tilberedes, og de angivne fortyndinger af dosis tilberedes dagligt, idet man må passe på, at prøverne ikke kontamineres og ødelægges.

Indgift af doser

40. TP indgives ved subkutan injektion og FT i oral sonde.

41. Testkemikaliet indgives ved oral sonde eller subkutan injektion. Dyrevelfærdshensyn og testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber tages i betragtning ved valg af indgiftsvej. Endvidere skal der tages hensyn til toksikologiske aspekter såsom relevansen af menneskers vej til eksponering for kemikaliet (f.eks. oral sonde over for modelindtagelse, subkutan injektion over for modelinhalation eller hudadsorption) og eksisterende toksikologisk information og data om metabolisme og kinetik (f.eks. behov for at undgå førstepassage-metabolisme, bedre effektivitet via en bestemt vej), før der iværksættes omfattende langtidstest, hvis der opnås positive resultater ved injektion.

42. Dyrene doseres på samme måde og med samme tidsinterval i 10 dage i træk med ca. 24 timers intervaller. Dosisniveauet justeres dagligt på grundlag af de samtidige daglige målinger af kropsvægt. Dosisvolumen og indgiftstidspunkt registreres på hver eksponeringsdag. Man skal passe på ikke at overskride den maksimale dosis, jf. pkt. 35, for at sikre en meningsfuld datafortolkning. Reduktion af kropsvægt, kliniske tegn og andre fund vurderes grundigt i den forbindelse. Ved oral sondefodring anvendes en mavesonde eller en passende intubationskanyle. Hvor stor en væskemængde, der kan indgives på én gang, afhænger af forsøgsdyrets størrelse. Lokale retningslinjer for pleje af dyr skal følges, men mængden bør ikke overstige 5 ml/kg kropsvægt undtagen i tilfælde af vandige opløsninger, hvor der kan bruges 10 ml/kg kropsvægt. Ved subkutane injektioner indgives doserne i de dorsoskapulære og lumbale regioner ved hjælp af en steril nål (f.eks. kaliber 23 eller 25) og en tuberkulinsprøjte. Det er valgfrit, om injektionsområdet barberes. Evt. tab eller lækage på injektionsstedet eller ufuldstændig dosering registreres. Det samlede injicerede volumen pr. rotte pr. dag må ikke overstige 0,5 ml/kg kropsvægt.

Særlige procedurer for androgenagonister

43. Til testen for androgenagonister er vehiklet den negative kontrol, og den TP-behandlede gruppe er den positive kontrol. Biologisk aktivitet i overensstemmelse med androgenagonister testes ved at give behandlingsgrupperne et testkemikalie i de valgte doser i 10 dage i træk. Vægten af de fem sekundære kønsvæv fra testkemikaliegrupperne sammenlignes med vehikelgruppen for statistisk signifikante vægtstigninger.

Særlige procedurer for androgenantagonister og 5α-reduktasehæmmere

44. Til testen for androgenantagonister og 5α-reduktasehæmmere er den TP-behandlede gruppe den negative kontrol, og gruppen, der samtidig har fået referencedoser af TP og FT, er den positive kontrolgruppe. Biologisk aktivitet i overensstemmelse med androgenantagonister og 5α-reduktasehæmmere testes ved at indgive en referencedosis TP og testkemikaliet i 10 dage i træk. Vægten af de fem sekundære kønsvæv fra TP-plus-testkemikaliegrupperne sammenlignes med den gruppe, der kun har fået reference-TP, for statistisk signifikante vægtstigninger.

OBSERVATIONER

Kliniske observationer

45. Generelle kliniske observationer foretages mindst én gang om dagen og hyppigere, hvis der observeres tegn på toksicitet. Observationer skal helst udføres på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til perioden for den forventede maksimale virkning efter dosering. Alle dyr observeres for mortalitet, morbiditet og generelle kliniske tegn såsom ændringer i adfærd, hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster).

46. Et dyr, som findes død, fjernes og bortskaffes uden yderligere dataanalyse. Et dyrs mortalitet før obduktion registreres i undersøgelsesrapporten sammen med evt. umiddelbare dødsårsager. Et moribund dyr aflives humant. Moribunde og efterfølgende aflivede dyr registreres i undersøgelsesrapporten med umiddelbare morbiditetsårsager.

Kropsvægt og foderindtagelse

47. Alle dyr vejes dagligt til nærmeste 0,1 g begyndende lige før indledningen af behandlingen, dvs. når dyrene fordeles i grupper. Som valgfri måling kan mængden af indtaget foder i behandlingsperioden måles pr. bur ved at veje fodringssystemerne. Resultaterne for foderindtagelsen udtrykkes i gram pr. rotte pr. dag.

Dissektion og måling af vævs- og organvægt

48. Ca. 24 timer efter den sidste indgift af testkemikaliet aflives rotterne og afblødes ifølge de normale procedurer for det laboratorium, som forestår undersøgelsen, og obduktionen udføres. Den humane aflivningsmetode registreres i laboratorierapporten.

49. Ideelt set skal obduktionsrækkefølgen være vilkårlig på tværs af grupper for at undgå progression direkte op eller ned i forhold til dosisgrupper, som kan påvirke dataene. Evt. fund ved obduktionen, dvs. patologiske ændringer/synlige læsioner, noteres og rapporteres.

50. De fem androgenafhængige væv (VP, SV, LABC, COW, GP) vejes. Disse væv udtages, renses omhyggeligt for overskydende bindevæv og fedt, og deres friske (ufikserede) vægt bestemmes. Hvert væv håndteres med særlig omhu for at undgå tab af væsker og udtørring, som kan give betydelige fejl og variabilitet ved at nedsætte den registrerede vægt. Flere af vævene kan være meget små eller vanskelige at dissekere, hvilket vil skabe variabilitet. Derfor

er det vigtigt, at personer, der udfører dissektion af sekundære kønsvæv, kender standardprocedurerne for dissektion af disse væv. OECD har udgivet en manual for standardoperationsprocedurer (SOP) ved dissektion (21). Omhyggelig træning efter SOP-vejledningen vil minimere en potentiel kilde til variation i undersøgelsen. Ideelt set skal den samme prosektor være ansvarlig for dissektion af et givet væv for at fjerne individuelle forskelle i vævsbehandling. Hvis dette ikke er muligt, udformes obduktionen således, at hver prosektor dissekerer et givet væv fra alle behandlingsgrupper i modsætning til, at én person dissekerer alle væv fra en kontrolgruppe, mens en anden er ansvarlig for behandlingsgrupperne. Hvert sekundært kønsvæv vejes uden aftørring til nærmeste 0,1 mg, og vægtværdierne registreres for hvert dyr.

51. Flere af vævene kan være meget små eller vanskelige at dissekere, hvilket vil skabe variabilitet. Tidligere arbejde har vist en række variationskoefficienter, som ser ud til at afvige på grund af laboratoriets kompetence. I nogle få tilfælde er der konstateret store forskelle i absolut vævsvægt såsom VP og COW hos et bestemt laboratorium.

52. Vægt af lever, parrede nyrer og parrede binyrer er valgfrie målinger. Igen skal væv være renset for bindevævshinder og fedt. Leveren vejes og registreres til nærmeste 0,1 g, og de parrede nyrer og binyrer vejes og registreres til nærmeste 0,1 mg. Lever, nyrer og binyrer påvirkes ikke blot af androgener, de giver også nyttige indekser for systemisk toksicitet.

53. Serummåling af luteiniserende hormon (LH), follikelstimulerende hormon (FSH) og testosteron (T) er valgfri. Serum-T-niveauer er nyttige til at fastslå, om testkemikaliet fremkalder levermetabolisme af testosteron og sænker serumniveauer. Uden T-data kunne en sådan virkning se ud til at ske via en antiandrogen mekanisme. LH-niveauer giver information om et antiandrogens evne til ikke blot at reducere organvægt, men også til at påvirke hypothalamus-hypofyse-funktionen, hvilket i langtidsundersøgelser kan fremkalde testistumorer FSH er et vigtigt hormon for spermatogenesen. Serum T4 og T3 er også valgfrie målinger, der giver nyttig supplerende information om evnen til at forstyrre thyroidehormonbalancen. Såfremt hormonmålingerne skal foretages, bedøves rotterne forud for obduktion, og blod udtages ved hjertepunktur, og bedøvelsesmetoden vælges omhyggeligt, således at den ikke påvirker hormonmålingen. Serumtilberedningsmetoden, kilden til radioimmunanalyse eller andet måleudstyr, analytiske procedurer samt resultater registreres. LH-niveauer anføres som ng pr. ml serum, og T anføres også som ng pr. ml serum.

54. Dissektionen af væv beskrives som følger, idet der er udgivet en detaljeret dissektionsvejledning med fotografier som supplerende materiale som led i valideringsprogrammet (21). En dissektionsvideo er også tilgængelig fra den koreanske fødevare- og lægemiddelstyrelses hjemmeside (22).

— Med dyrets ventrale overflade opad fastslås, om penis' forhud er adskilt fra glans penis. I bekræftende fald trækkes forhuden tilbage, og glans penis fjernes, vejes (nærmeste 0,1 mg), og vægten registreres.

— Åbn abdominalhud og -væg, så viscera ligger blottede. Såfremt de valgfrie organer vejes, fjernes og vejes leveren til nærmeste 0,1 g, mave og indvolde fjernes, de parrede nyrer og binyrer fjernes og vejes til nærmeste 0,1 mg. Ved denne dissektion eksponeres blæren, og dissektionen af hannens sekundære målvæv påbegyndes.

— VP dissekeres ved at adskille blæren fra det ventrale muskellag, idet bindevævet skæres langs midterlinjen. Fjern blæren fortil imod vesiculae seminales (SV), så venstre og højre prostatalap blotlægges ventralt (dækket af et lag fedt). Adskil omhyggeligt fedtet fra højre og venstre VP-lap. Fjern forsigtigt højre VP-lap fra uretra, og disseker uretralappen. Hold fast i højre VP-lap, og fjern forsigtigt venstre VP-lap fra uretra, og disseker. Vej til nærmeste 0,1 mg, og registrer vægten.

— For at dissekere vesiculae seminales med prostata anterior (SVGC) fjernes blæren bagtil, så vas deferens og højre og venstre lap af vesiculae seminales med prostata anterior (SVCG) blotlægges. Forebyg væskelækage ved hjælp af en karklemme ved grunden af SVCG'erne, hvor vas deferens hæfter på uretra. Disseker omhyggeligt SVCG'erne med karklemmen på plads, rens for fedt og adneksa, placer i et tareret vejekar, fjern karklemmen, vej til nærmeste 0,1 mg, og registrer vægten.

— For at dissekere levator ani-bulbocavernosus-musklerne (LABC) blotlægges musklerne og penis' basis. LA-musklerne vikler sig omkring colon, mens LA anterior og BC-musklerne hæfter på bulbus penis. Hud og adneksa fra det perianale område, der strækker sig fra penis' basis til den forreste del af anus, fjernes. BC-musklerne dissekeres gradvist fra bulbus penis og væv. Colon skæres i to, og hele LABC kan dissekeres og fjernes. LABC renses for fedt og adneksa, vejes til nærmeste 0,1 mg, og vægten registreres.

— Efter fjernelse af LABC er de runde Cowpers (COW) eller bulbouretrale kirtler synlige ved basis af og lidt dorsalt i forhold til bulbus penis. For at forhindre væskelækage er omhyggelig dissektion påkrævet for at undgå at ramme den tynde kapsel. Vej de parrede COW til nærmeste 0,1 mg, og registrer vægten.

— Hvis der tabes væske fra en kirtel under obduktion og dissektion, skal det registreres.

55. Hvis vurderingen af hvert kemikalie kræver obduktion af flere dyr, end det er rimeligt for en enkelt dag, kan undersøgelsens start forskydes over to på hinanden følgende dage, hvilket fører til forskydning af obduktion og arbejdet i den forbindelse over to dage. Foretages en sådan forskydning, anvendes halvdelen af dyrene pr. behandlingsgruppe pr. dag.

56. Kadavere bortskaffes på passende vis efter obduktion.

RAPPORTERING

Data

57. Data rapporteres individuelt (dvs. kropsvægt, vægt af sekundære kønsvæv, valgfrie målinger og andre reaktioner og observationer) og for hver gruppe af dyr (gennemsnit og standardafvigelser for alle målingerne). Data opsummeres i tabelform. Dataene skal vise antallet af dyr ved testens begyndelse, antallet af dyr, som blev fundet døde under testen eller fundet med tegn på toksicitet, en beskrivelse af de observerede tegn på toksicitet, herunder begyndelsestidspunkt, varighed og sværhedsgrad.

58. Den endelige rapport skal indeholde:

Testlaboratorium

— laboratoriets navn, placering

— forsøgsleder og andre medarbejdere og deres undersøgelsesansvar

— datoer for undersøgelsens begyndelse og afslutning, dvs. henholdsvis første dag for indgift af testkemikaliet og sidste dag for obduktion.

Testkemikalie

— oprindelse, parti-/batchnummer, betegnelse, renhed, leverandørens fuldstændige adresse og karakterisering af testkemikalie(r)

— fysisk form og, hvor det er relevant, fysisk-kemiske egenskaber

— opbevaringsforhold samt metode og frekvens for tilberedning af fortynding

— evt. data genereret vedrørende stabilitet

— evt. analyser af testopløsninger/-suspensioner.

Vehikel

— karakterisering af vehikel (betegnelse, leverandør og batchnr.)

— begrundelse for valg af vehikel (hvis andet end vand).

Forsøgsdyr og procedurer for dyrehold

— anvendt art/stamme og begrundelse for valg

— dyrenes oprindelse eller leverandør, herunder fuldstændig adresse

— antal leverede dyr og deres alder

— miljøbetingelser (temperatur, belysning osv.)

— foder (navn, type, leverandør, partinummer, indhold, og hvis det er kendt, fytoøstrogenniveauer)

— strøelse (navn, type, leverandør, indhold)

— anbringelsesforhold og antal dyr pr. bur.

Assaybetingelser

— alder ved kastration og akklimatiseringens varighed efter kastration

— de enkelte dyrs vægt ved undersøgelsens begyndelse (til nærmeste 0,1 g)

— randomiseringsproces og registrering af fordelingen til vehikel-, reference-, testkemikaliegrupper og bur

— kropsvægtgennemsnit og -standardafvigelse for hver gruppe for hver vejedag under hele undersøgelsen

— rationale for valg af dosis

— indgift af testkemikalie og rationale for valg af eksponeringsvej

— i tilfælde af assay for antiandrogenicitet, TP-behandling (dosis og volumen)

— testkemikaliebehandling (dosis og volumen)

— doseringstidspunkt

— obduktionsprocedurer, herunder afblødningsmetoder og evt. bedøvelsesmidler

— hvis der foretages serumanalyser, oplyses metode Hvis der f.eks. foretages radioimmunanalyse (RIA), rapporteres RIA-procedure, leverandør af RIA-udstyr, udstyrets udløbsdatoer, procedurer for scintillationstælling og standardisering.

Resultater

— daglige observationer for hvert dyr under dosering, herunder:

— kropsvægt (til nærmeste 0,1 g)

— (evt.) kliniske tegn

— måling af eller notater vedrørende foderindtagelse

— obduktionsobservationer for hvert dyr, herunder:

— obduktionsdato

— dyrets behandlingsgruppe

— dyret id

— prosektor

— tidspunkt på dagen, hvor obduktion og dissektion er foretaget

— dyrets alder

— endelig kropsvægt ved obduktion med angivelse af statistisk signifikant stigning eller fald

— rækkefølge for afblødning og dissektion af dyret ved obduktion

— vægt for de fem androgenafhængige målvæv:

— ventral prostata (til nærmeste 0,1 mg)

— vesiculae seminales med prostata anterior, inkl. væske (parrede til nærmeste 0,1 mg)

— levator ani plus bulbocavernosus-muskelkompleks (til nærmeste 0,1 mg)

— Cowpers kirtler (frisk vægt — parrede, til nærmeste 0,1 mg)

— glans penis (frisk vægt til nærmeste 0,1 mg)

— vægt af valgfrie væv, hvis de måles:

— lever (til nærmeste 0,1 g)

— nyrer (parrede, til nærmeste 0,1 mg)

— binyrer (parrede, til nærmeste 0,1 mg)

— generelle bemærkninger og kommentarer

— evt. serumanalyser af hormoner

— serum LH (valgfrit — ng pr. ml serum)

— serum T (valgfrit — ng pr. ml serum)

— generelle bemærkninger og kommentarer.

Opsummering af data

Data opsummeres i tabelform indeholdende prøvestørrelse for hver gruppe, middelværdi og standardmiddelfejl eller standardafvigelse. Tabellerne skal indeholde kropsvægt ved obduktion, ændringer i kropsvægt fra doseringens begyndelse indtil obduktion, vægt af sekundære målkønsvæv og evt. valgfri organvægt.

Diskussion af resultater

Analyse af resultater

59. Krops- og organvægt ved obduktion analyseres statistisk for kendetegn såsom varianshomogenitet med passende transformation af data efter behov. Behandlingsgrupper sammenlignes med en kontrolgruppe under anvendelse af teknikker såsom ANOVA efterfulgt af parvise sammenligninger (f.eks. Dunnetts ensidede test) og kriteriet for statistisk forskel, f.eks. $p \leq 0{,}05$. De grupper, som opnår statistisk signifikans, identificeres. »Relativ organvægt« bør dog undgås på grund af de ugyldige statistiske antagelser, der ligger til grund for denne datamanipulation.

60. For androgen agonisme skal kontrollen være testgruppen, som kun får vehikel. Et testkemikalies karakteristiske virkemåde kan føre til forskellige relative reaktioner mellem væv, f.eks. trenbolon, som ikke kan være 5α-reduceret og har mere udtalte virkninger på LABC og GP, end TP har. En statistisk signifikant stigning ($p \leq 0{,}05$) i to eller flere af de fem androgenafhængige målvævs vægt (VP, LABC, GP, CG og SVCG) betragtes som et positivt androgenagonistresultat, og alle målvæv bør udvise en vis grad af vækstforøgelse. En kombineret evaluering af alle sekundære kønsorganers vævsreaktioner kan fås gennem en passende flerdimensional dataanalyse. Dette kan forbedre analysen, især i tilfælde, hvor kun et enkelt væv giver en statistisk signifikant respons.

61. For androgenantagonisme skal kontrollen være den testgruppe, som kun får referenceandrogen (kun testosteronpropionat). Et testkemikalies karakteristiske virkemåde kan føre til forskellige relative reaktioner mellem væv, f.eks. har 5α-reduktasehæmmere som finasterid mere udtalte virkninger på ventral prostata end andre væv sammenlignet med potente AR-antagonister såsom flutamid. En statistisk signifikant reduktion ($p \leq 0{,}05$) i to eller flere af de fem androgenafhængige målvævs vægt (VP, LABC, GP, CG og SVCG) i forhold til TP-behandling alene betragtes som et positivt androgenantagonistresultat, og alle målvæv bør udvise en vis grad af vækstreduktion. En kombineret evaluering af alle sekundære kønsorganers vævsreaktioner kan fås gennem en passende flerdimensional dataanalyse. Dette kan forbedre analysen, især i tilfælde, hvor kun et enkelt væv giver en statistisk signifikant respons.

62. Data opsummeres i tabelform indeholdende middelværdi, standardmiddelfejl (standardafvigelse vil også være acceptabel) og prøvestørrelse for hver gruppe. Individuelle datatabeller medtages også. De individuelle værdier, middelværdi, standardmiddelfejl (standardafvigelse) og variationskoefficientværdier for kontroldataene undersøges for at fastslå, om de opfylder acceptable kriterier for konsistens med forventede tidligere værdier. Variationskoefficienter, der overskrider variationskoefficientværdier anført i tabel 1 (se pkt. 25 og 26) for hver organvægt, afgør, om der er fejl i dataregistrering eller -indlæsning, eller om laboratoriet endnu ikke har behersket nøjagtig

dissektion af de androgenafhængige væv, og yderligere uddannelse/praksis er berettiget. Normalt er variationskoefficienter (standardafvigelsen divideret med den gennemsnitlige organvægt) reproducerbar fra laboratorium til laboratorium og fra undersøgelse til undersøgelse. De fremlagte data skal som minimum omfatte: vægt af ventral prostata, vesiculae seminales, levator ani plus bulbocavernosus, Cowpers kirtler, glans penis, lever samt kropsvægt og kropsvægtændring fra begyndelsen af doseringen til obduktion. Dataene kan også præsenteres efter kovariansjustering for kropsvægt, men dette erstatter ikke fremlæggelse af de ujusterede data. Såfremt præputial separation (PPS) ikke forekommer i nogen af grupperne, registreres desuden PPS-forekomsten, der sammenlignes statistisk med kontrolgruppen under anvendelse af Fisher Exact-testen.

63. Ved kontrol af computerindlæsninger af data med de originale datablade med henblik på nøjagtighed skal organvægtværdier, som ikke er biologisk plausible eller varierer med mere end tre standardafvigelser fra den pågældende behandlingsgruppes gennemsnit, nøje undersøges, og man kan være nødt til at se bort fra dem, da de sandsynligvis er registreringsfejl.

64. En sammenligning af undersøgelsesresultater med OECD's variationskoefficientværdier (i tabel 1) er ofte et vigtigt skridt i fortolkningen af undersøgelsesresultaternes validitet. Tidligere data for vehikelkontrolgrupper opbevares i laboratoriet. Tidligere data for reaktioner på positive referencekemikalier såsom TP og FT skal også opbevares i laboratoriet. Laboratorierne kan også periodisk teste reaktionen på kendte svage androgenagonister og -antagonister og opbevare disse data. Disse data kan sammenlignes med tilgængelige OECD-data for at sikre, at laboratoriets metoder giver tilstrækkelig statistisk præcision og styrke.

Tillæg 1

DEFINITIONER

Androgen er en term, der bruges til at beskrive en positiv påvirkning af væksten af androgenafhængige væv.

Antiandrogen er et kemikalies evne til at undertrykke virkningen af TP i et pattedyrs organisme.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

Fødselsdato er dag 0 efter fødslen (PND).

Dosis er mængden af indgivet testkemikalie. For Hershberger-bioassayet udtrykkes dosis som vægt af et testkemikalie pr. enhed af forsøgsdyrets kropsvægt pr. dag (f.eks. mg/kg kropsvægt/dag).

Dosering er en generel term, som omfatter dosis samt doseringsfrekvens og -varighed.

Moribund er en term, der bruges til at beskrive et dyr, som er døende.

Postnatal dag X er den X. levedag efter fødselsdagen (PND).

Følsomhed er en testmetodes evne til korrekt at identificere kemikalier, der har den egenskab, som der testes for.

Specificitet er en testmetodes evne til korrekt at identificere kemikalier, der ikke har den egenskab, som der testes for.

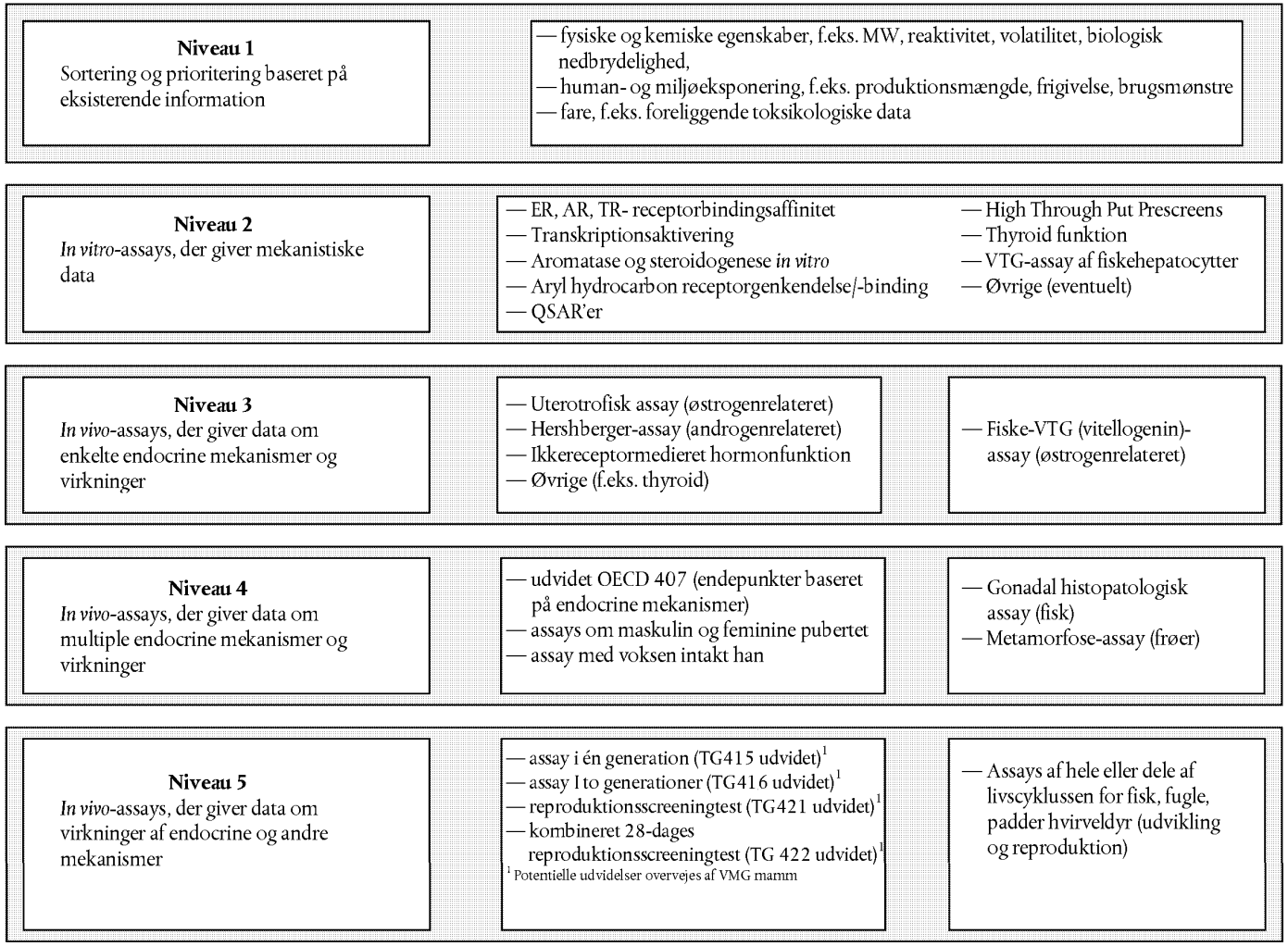
Testkemikalie betyder et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

Validering er en videnskabelig proces til at karakterisere en testmetodes operationelle krav og begrænsninger og påvise dens pålidelighed og relevans til et bestemt formål.

Tillæg 2

Note: Dokument udarbejdet af sekretariatet for testvejledningsprogrammet baseret på den aftale, der blev indgået på det sjette møde i EDTA-taskforcen

OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals



VMG mamm: Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment

NOTER TIL RAMMEN

Note 1: Det er muligt at gå ind og ud på alle niveauer; afhænger af arten af eksisterende informationsbehov med henblik på fare- og risikovurdering.

Note 2: På niveau 5 skal økotoksikologi omfatte endepunkter, der viser skadelige virkningsmekanismer og potential skade på befolkningen.

Note 3: Når en multimodal model dækker flere single endpoint assays, vil modellen erstatte brugen af de pågældende single endpoint assays.

Note 4: Vurderingen af hvert kemikalie skal ske i hvert enkelt tilfælde under inddragelse af al tilgængelig information og under hensyntagen til rammeniveauernes funktion.

Note 5: Rammen omfatter ikke alt på det givne tidspunkt. På niveau 3, 4 og 5 omfatter den assays, der enten er tilgængelige, eller hvor valideringen er på vej. Med hensyn til sidstnævnte er disse foreløbigt inkluderet. Når de er udviklet og valideret, vil de blive formelt tilføjet til rammen.

Note 6: Niveau 5 omfatter ikke kun endelige test. Test inkluderet på dét niveau bidrager til generel fare- og risikovurdering.

LITTERATUR

1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10.-11. marts 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment Nº 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413-422.

10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.

17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

21) Supplemental materials for Owens et al. (2006) The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Se afsnit II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf

22) Korea Food and Drug Administration. Visuelt opslagsværk om Hershberger-assayproceduren, herunder en dissektionsvideo. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html

23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

26) Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2010/63/EU af 22. september 2010 om beskyttelse af dyr, der anvendes til videnskabelige formål (EUT L 276 af 20.10.2010, s. 33).

27) Følgende kapitler i dette bilag:

B.1.A, Akut oral toksicitet — fastdosismetoden

B.1.B, Akut oral toksicitet — akut toksicitetsklassemetoden

B.56 UDVIDET REPRODUKTIONSTOKSICITETSUNDERSØGELSE I ÉN GENERATION

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 443 (2012). Den er baseret på forslaget fra International Life Science Institute (ILSI)-Health and Environmental Sciences Institute (HESI), Agricultural Chemical Safety Assessment (ACSA) Technical Committee til en F_1-udvidet livsstadie-reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation som offentliggjort i Cooper et al., 2006 (1). Der er foretaget flere forbedringer og præciseringer i undersøgelsesdesignet for at sikre fleksibilitet og understrege betydningen af at begynde med eksisterende viden og samtidig bruge observationer i levende live til at styre og skræddersy testen. Denne testmetode giver en detaljeret beskrivelse af den operationelle udførelse af en udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation. Testmetoden indeholder en beskrivelse af tre kohorter af F_1-dyr:

kohorte 1: vurdering af reproduktions-/udviklingsmæssige endepunkter. Denne kohorte kan udvides til at omfatte en F_2-generation

kohorte 2: vurdering af den potentielle virkning af kemikalieeksponering på det endnu ikke færdigudviklede nervesystem

kohorte 3: vurdering af den potentielle virkning af kemikalieeksponering på det endnu ikke færdigudviklede immunsystem.

2. Beslutninger om, hvorvidt den anden generation skal vurderes, og udviklingsneurotoksicitetskohorten og/eller udviklingsimmunotoksicitetskohorten udelades, skal afspejle eksisterende viden om det kemikalie, som evalueres, samt forskellige myndigheders behov. Formålet med testmetoden er at skaffe oplysninger om, hvordan undersøgelsen kan udføres, og vise, hvordan hver kohorte skal evalueres.

3. Proceduren for beslutningen om, hvad der internt udløser produktionen af en anden generation, beskrives i OECD's vejledning 117 (39) for de regeludstedende myndigheder, som anvender interne triggere.

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG FORMÅL

4. Hovedformålet med den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation er at vurdere specifikke livsstadier, som ikke er dækket af andre typer af toksicitetsundersøgelser, og teste for virkninger, der kan forekomme som resultat af eksponering for kemikalier før og efter fødslen. Som endepunkter for reproduktionsevnen er det planen, at der som første trin bruges evt. tilgængelig information fra undersøgelser med gentagen dosis (bl.a. screeningundersøgelser af reproduktionstoksicitet, f.eks. OECD TG 422 (32)) eller korttidsscreeningassays af hormonforstyrrende stoffer (f.eks. et uterotrofisk assay — testmetode B.54 (36) og Hershberger-assay — testmetode B.55 (37)) til at detektere virkninger på hanners og hunners reproduktionsorganer. Det kunne omfatte spermatogenese (testikulær histopatologi) for hanner og brunstcyklusser, follikeltælling/oocytmodning og ovarieintegritet (histopatologi) for hunner. Den udvidedereproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation tjener herefter som test for endepunkterne for reproduktionsevnen, som kræver samspil mellem hanner og hunner, hunner med conceptus og hunner med afkom og F_1-generationen indtil efter kønsmodning (se OECD's vejledning 151, som underbygger denne testmetode (40)).

5. Testmetoden er udformet, så den giver en evaluering af kemikaliers præ- og postnatale virkninger på udviklingen samt en grundig evaluering af systemisk toksicitet hos drægtige og diegivende hunner og ungt og voksent afkom. En detaljeret undersøgelse af vigtige udviklingsmæssige endepunkter såsom afkommets levedygtighed, neonatale sundhed, udviklingsmæssige status ved fødslen og fysiske og funktionsmæssige udvikling indtil voksenalderen forventes at afdække bestemte målorganer hos afkommet. Endvidere vil undersøgelsen give og/eller bekræfte oplysninger om et testkemikalies virkninger på voksne hanners og hunners forplantningssystemers integritet og ydeevne. Specifikt, men ikke udelukkende, betragtes følgende parametre: gonadefunktion, brunstcyklus, modning af sperma i epididymis, parringsadfærd, konception, drægtighed, nedkomst og diegivning. Endvidere vil oplysninger fra udviklingsneurotoksicitets- og udviklingsimmunotoksicitetsvurderingerne karakterisere potentielle virkninger i de pågældende systemer. Data afledt af disse test bør give mulighed for at bestemme niveauer uden observerede negative effekter (NOAEL'er), laveste niveauer for observerede negative effekter (LOAEL'er) og/eller benchmarkdoser for de forskellige endepunkter og/eller kan bruges til at karakterisere virkninger detekteret i tidligere undersøgelser med gentagen dosis og/eller tjene som vejledning for efterfølgende test.

6. En skematisk tegning af protokollen kan ses i figur 1. Testkemikaliet indgives kontinuerligt i graduerede doser til forskellige grupper af kønsmodne hanner og hunner. Denne forældregeneration (P-generation — F_0) modtager testkemikaliet i en defineret periode før parring (valgt på grundlag af tilgængelig information om testkemikaliet, men mindst to uger) og i en to uger lang parringsperiode. P-hanner behandles yderligere mindst indtil fravænning af F_1. De behandles i mindst 10 uger. De kan behandles længere, hvis der er behov for at afklare virkninger på reproduktionen. Behandling af P-hunnerne fortsættes under drægtighed og diegivning, indtil deres kuld er fravænnet (dvs. 8-10 ugers behandling). F_1-afkommet modtager yderligere behandling med testkemikaliet fra fravænning til voksenalderen. Hvis en anden generation vurderes (se OECD's vejledning 117 (39)), skal F_1-afkommet fortsat være under behandling indtil fravænningen af F_2, eller indtil undersøgelsen afsluttes.

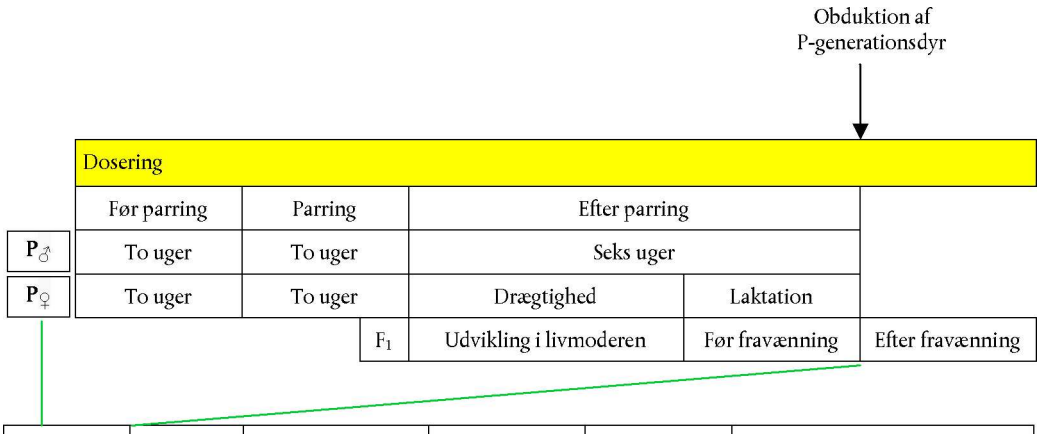
7. Kliniske observationer og patologiske undersøgelser udføres på alle dyr for tegn på toksicitet med særlig vægt på hanners og hunners forplantningssystemers integritet og ydeevne samt afkommets sundhed, vækst, udvikling og funktionsevne. Ved fravænningen tilordnes udvalgte unger til særlige undergrupper (kohorte 1-3, se pkt. 33 og 34 og figur 1) til yderligere undersøgelser, bl.a. kønsmodning, kønsorganernes integritet og funktion, neurologiske og adfærdsmæssige endepunkter samt immunfunktioner.

8. Ved gennemførelse af undersøgelsen følges de vejledende principper og overvejelser, der er anført i OECD's vejledning nr. 19, om anerkendelse, vurdering og anvendelse af kliniske tegn som humane endepunkter for forsøgsdyr, der bruges i sikkerhedsevalueringer (34).

9. Når et tilstrækkeligt antal undersøgelser er tilgængelige til at konstatere, hvordan dette nye undersøgelsesdesign virker, skal testmetoden gennemgås og om nødvendigt revideres på baggrund af de indhøstede erfaringer.

Figur 1

Skema over den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation



Forældre-generation	Kohorte	Betegnelse	Dyr/kohorte	Kønsmodning	Omtrentlig alder ved obduktion (uger)
Målet er 20 kuld pr. gruppe	1A	Reproduktiv	20 M + 20 F	Ja	13
	1B	Reproduktiv	20 M + 20 F	Ja	14 eller 20-25, hvis dette tilsiges
	2A	Neurotoksicitet	10 M + 10 F @	Ja	11-12
	2B	Neurotoksicitet	10 M + 10 F @	Nej	3
	3	Immunotoksicitet	10 M + 10 F @	Ja	8
	Overskud	Reserver		Nej	3

@ én pr. kuld og repræsentativt for 20 kuld, hvis det er muligt

BESKRIVELSE AF METODEN/FORBEREDELSER TIL TESTEN

Dyr

Valg af dyreart og stamme

10. Valget af art til reproduktionstoksicitetstesten overvejes nøje med udgangspunkt i al tilgængelig information. På grund af omfanget af baggrundsdata og sammenligneligheden med generelle toksicitetstest foretrækkes rotten dog normalt, og kriterier og henstillinger i denne testmetode vedrører denne art. Hvis en anden art anvendes, skal det begrundes, og relevante ændringer i protokollen vil være nødvendige. Stammer med lav frugtbarhed eller en velkendt høj forekomst af spontane udviklingsdefekter bør ikke anvendes.

Alder, kropsvægt og inddragelseskriterier

11. Der anvendes sunde forældredyr, som ikke har været omfattet af tidligere testprocedurer. Både hanner og hunner skal undersøges, og hunnerne må ikke tidligere have født eller være drægtige. P-dyrene skal være kønsmodne, af samme vægt (inden for køn) ved indledning af doseringen, være af samme alder (ca. 90 dage) ved parring og være repræsentative for den undersøgte art og stamme. Dyrene akklimatiseres i mindst fem dage efter ankomst. Dyrene tilordnes vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupper på en måde, som giver sammenlignelige gennemsnitlige kropsvægtværdier mellem grupperne (dvs. ± 20 % af gennemsnittet).

Miljøbetingelser og fodring

12. Temperaturen i forsøgsdyrrummet skal være 22 °C (± 3 °C). Den relative luftfugtighed skal være 30-70 % med et ideelt niveau på 50-60 %. Den kunstige belysning fastsættes til 12 timers lys og 12 timers mørke. Der kan

anvendes normalt laboratoriefoder med ubegrænset forsyning af drikkevand. Foderets fytoøstrogene indhold overvåges nøje, da et højt fytoøstrogenniveau i foderet kan påvirke visse reproduktionsmæssige endepunkter. Standardiseret foder med oplyst sammensætning og reduceret indhold af østrogene kemikalier anbefales (2) (30). Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende iblanding af testkemikaliet, når denne indgiftsmåde anvendes. Testkemikaliets indhold, homogenitet og stabilitet i foderet skal kontrolleres. Foder og drikkevand analyseres jævnligt for forurenende stoffer. Prøver på hver batch foder, der anvendes under undersøgelsen, opbevares under passende forhold (f.eks. frosset ved – 20 °C), indtil rapporten er færdig, i tilfælde af at resultaterne kræver en yderligere analyse af foderingredienserne.

13. Dyrene anbringes i bure i små grupper af samme køn og behandlingsgruppe. De kan anbringes enkeltvis for at undgå mulige skader (f.eks. hanner efter parringsperioden). Parring skal finde sted i egnede bure. Efter bevis for kopulation anbringes hunner, som antages at være drægtige, separat i fødsels- eller yngelbure, hvor de forsynes med passende og defineret redemateriale. Kuldene anbringes med deres mødre indtil fravænning. F_1-dyr anbringes i små grupper af samme køn og behandlingsgruppe fra fravænning til undersøgelsens afslutning. Hvis det er sagligt begrundet, kan dyrene anbringes individuelt. Indholdet af fytogenøstrogener i det valgte strøelsesmateriale skal være minimalt.

Antal og identifikation af dyr

14. Normalt skal hver forsøgs- og kontrolgruppe indeholde et tilstrækkeligt antal parrede dyr til, at der kan blive mindst 20 drægtige hunner pr. dosisgruppe. Formålet hermed er at sikre, at der produceres tilstrækkelig meget afkom til, at der kan foretages en meningsfuld vurdering af kemikaliets potentielle virkning på fertilitet, drægtighed og moderdyrenes adfærd i P-generationen samt vækst og udvikling i F_1-generationen fra konception til kønsmodning. Hvis det ikke lykkes at frembringe det ønskede antal drægtige dyr, er undersøgelsen ikke nødvendigvis ugyldig, og der bør finde en konkret vurdering sted i det enkelte tilfælde, idet en mulig årsagssammenhæng med testkemikaliet overvejes.

15. Hvert P-dyr tildeles et entydigt identifikationsnummer, før doseringen påbegyndes. Såfremt tidligere laboratoriedata tyder på, at en signifikant del af hunnerne måske ikke har regelmæssige (fire- eller femdages) brunstcyklusser, anbefales det at foretage en vurdering af brunstcyklusserne før behandlingens start. Alternativt kan gruppestørrelsen øges for at sikre, at mindst 20 hunner i hver gruppe har regelmæssige (fire- eller femdages) brunstcyklusser ved behandlingens begyndelse. Alt F_1-afkom identificeres entydigt, når de nyfødte undersøges første gang på dag 0 eller 1 efter fødslen (PND) Under hele undersøgelsen registreres det for alle udvalgte F_1-dyr og evt. F_2-dyr, hvilket kuld de er fra.

Testkemikalie

Tilgængelig information om testkemikaliet

16. Det er vigtigt at gennemgå eksisterende information med henblik på beslutninger om indgiftsvej, valg af vehikel, valg af dyreart, valg af doseringer og potentielle ændringer af doseringsplan. Derfor skal alle relevante tilgængelige informationer om testkemikaliet, dvs. fysisk-kemiske, toksikokinetiske (herunder artsspecifik metabolisme), toksikodynamiske egenskaber, struktur-aktivitetsrelationer (SAR), metaboliske processer in vitro, resultater af tidligere toksicitetsundersøgelser og relevant information om strukturelt beslægtede stoffer, tages i betragtning ved planlægning af den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation. Foreløbig information om absorption, distribution, metabolisme og eliminering (ADME) og bioakkumulation kan afledes af kemisk struktur, fysisk-kemiske data, omfanget af plasmaproteinbinding eller toksikokinetiske (TK) undersøgelser, mens resultater af toksicitetsundersøgelser giver supplerende information, f.eks. om NOAEL, metabolisme eller induktion af metabolisering.

Overvejelser om toksikokinetiske data

17. TK-data fra tidligere gennemførte range-finding-undersøgelser af dosis eller andre undersøgelser er ikke påkrævede, selv om de er særdeles nyttige ved planlægningen af undersøgelsesdesign, valg af dosisniveauer og fortolkning af resultater. Særligt nyttige er data, som: 1) kontrollerer eksponering af ikkefærdigudviklede fostre samt unger for testkemikaliet (eller relevante metabolitter), 2) giver et skøn over intern dosimetri og 3) evaluerer potentiel

dosisafhængig mætning af kinetiske processer. Evt. supplerende TK-data såsom metabolitprofiler, koncentrationstidsforløb osv. skal også overvejes. Supplerende TK-data kan også indsamles i løbet af hovedundersøgelsen, forudsat at det ikke griber forstyrrende ind i indsamling og fortolkning af hovedundersøgelsens endepunkter.

Som en generel vejledning vil følgende TK-datasæt være nyttige i planlægningen af den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation:

— sen drægtighed (f.eks. den 20. dag i drægtighedsperioden) — moderens blod, fostrets blod

— midt i diegivningsperioden (PND 10) — moderens blod, ungens blod og/eller mælk

— tidlig fravænningsperiode (f.eks. PND 28) — prøver fra det fravænnede dyr.

Der udvises fleksibilitet ved bestemmelsen af specifikke analyter (f.eks. oprindeligt kemikalie og/eller metabolitter) og prøveudtagningsplan. F.eks. vil antallet af og tidspunkter for prøveindsamlinger på en given prøveindsamlingsdag afhænge af eksponeringsvej og forudgående viden om TK-egenskaber hos ikkedrægtige dyr. Til foderundersøgelser er prøvetagning på et enkelt konsistent tidspunkt på hver af disse dage tilstrækkeligt, mens sondedosering kan kræve yderligere prøvetagningstidspunkter for at opnå et bedre skøn over spektret af interne doser. Det er dog ikke nødvendigt at generere et fuldt koncentrationstidsforløb på nogen af prøvetagningsdagene. Om nødvendigt kan blod samles efter køn inden for kuld med henblik på foster- og neontalanalyser.

Indgiftsvej

18. Ved valg af indgiftsvej tages hensyn til de(n) vej(e), som er mest relevant(e) i forbindelse med human eksponering. Skønt protokollen er designet til indgift af testkemikaliet gennem foderet, kan den ændres til indgift ad andre veje (drikkevand, sonde, inhalation, dermal optagelse) alt efter kemikaliets karakteristika og de ønskede oplysninger.

Valg af vehikel

19. Hvor det er nødvendigt, opløses eller suspenderes kemikaliet i et egnet vehikel. Hvor det er muligt, anbefales det først at se på anvendelsen af en vandig opløsning/suspension og herefter en opløsning/suspension i olie (f.eks. majsolie). For andre vehikler end vand skal vehiklets toksiske egenskaber være kendt. Anvendelsen af vehikler med potentiel iboende toksicitet skal undgås (f.eks. acetone, DMSO). Testkemikaliets stabilitet i vehiklet skal bestemmes. Der tages hensyn til følgende karakteristika, hvis et vehikel eller andet tilsætningsstof anvendes til at lette doseringen: indvirkningen på testkemikaliets absorption, distribution, metabolisme eller retention; virkninger på testkemikaliets kemiske egenskaber, som kan ændre dets toksiske karakteristika, samt indvirkningen på dyrenes føde- og vandindtagelse eller ernæringstilstand.

Valg af dosis

20. Normalt skal undersøgelsen omfatte mindst tre dosisniveauer og en sideløbende kontrol. Ved valg af passende dosisniveauer skal undersøgeren se på al tilgængelig information, herunder doseringsinformation fra tidligere undersøgelser, TK-data fra drægtige eller ikkedrægtige dyr, omfanget af mælkeoverførsel og skøn over human eksponering. Hvis tilgængelige TK-data viser dosisafhængig mætning af TK-processer, skal høje dosisniveauer, der klart viser mætning, omhyggeligt undgås, forudsat naturligvis, at menneskers eksponeringer forventes at ligge en del under mætningspunktet. I sådanne tilfælde skal det højeste dosisniveau ligge på eller bare lidt over vendepunktet for overgangen til ikkelineær TK-adfærd.

21. I mangel af relevante TK-data baseres dosisniveauerne på toksiske virkninger, medmindre de er begrænset af testkemikaliets fysisk-kemiske art. Er dosisniveauerne baseret på toksicitet, vælges den højeste dosis med det formål at fremkalde en vis systemisk toksicitet, men ikke dyrets død eller alvorlig lidelse.

22. En faldende række dosisniveauer vælges for at påvise evt. dosisafhængige virkninger og fastslå NOAEL'er eller doser nær detektionsgrænsen, som vil give mulighed for at udlede en benchmarkdosis for de mest følsomme endepunkter. For at undgå store dosismellemrum mellem NOAEL'er og LOAEL'er er to- eller firefoldsintervaller ofte optimalt. Det foretrækkes ofte at tilføje en fjerde testgruppe i stedet for at anvende et meget stort interval (f.eks. mere end en faktor 10) mellem doserne.

23. Med undtagelse af behandling med testkemikaliet håndteres dyr i kontrolgruppen på samme måde som testgruppens dyr. Denne gruppe skal være ubehandlet eller have placebo eller være en vehikelkontrolgruppe, hvis der anvendes et vehikel til indgift af testkemikaliet. Hvis der bruges et vehikel, skal kontrolgruppen have vehiklet i den højeste mængde, der bruges.

Grænsetest

24. Såfremt der ikke er evidens for toksicitet ved en dosis på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag i undersøgelser med gentagen dosis, eller hvis data fra strukturelt og/eller metabolisk beslægtede kemikalier, som ligner hinanden med hensyn til in vivo/in vitro-metaboliske egenskaber ikke giver anledning til at forvente toksicitet, er en undersøgelse med flere dosisniveauer måske ikke nødvendig. I sådanne tilfælde kunne den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation foretages med en kontrolgruppe og en enkelt dosis på mindst 1 000 mg/kg kropsvægt/dag. Skulle der imidlertid blive konstateret evidens for reproduktions- eller udviklingsmæssig toksicitet ved denne grænsedosis, vil yderligere undersøgelser ved lavere dosisniveauer være påkrævet for at identificere NOAEL. Disse grænsetestovervejelser gælder kun, når human eksponering ikke indikerer behovet for et højere dosisniveau.

PROCEDURER

Eksponering af afkom

25. Fodereksponering er den foretrukne indgiftsmetode. Hvis der udføres undersøgelser med indgift gennem sonde, skal det bemærkes, at ungerne normalt kun får testkemikaliet indirekte gennem mælken, indtil direkte dosering begynder for dem ved fravænning. I undersøgelser med indgift gennem foder eller drikkevand vil ungerne desuden modtage testkemikaliet direkte, når de begynder selv at æde i den sidste uge af laktationsperioden. Ændringer i undersøgelsesdesignet skal overvejes, når udskillelse af testkemikaliet i mælken er dårlig, og hvis der mangler evidens for, at afkommet stadig eksponeres. I disse tilfælde overvejes en direkte dosering af unger i laktationsperioden på grundlag af tilgængelig TK-information, toksicitet i afkommet eller ændringer i biomarkører (3) (4). Fordele og ulemper overvejes omhyggeligt, før der foretages undersøgelser med direkte dosering på unger i laktationsperioden (5).

Doseringsplan og indgift af doser

26. Nogle oplysninger om brunstcyklusser, histopatologi for hanners og hunners forplantningssystem og analyse af testis-/epididymissperma kan være tilgængelige fra tidligere toksicitetsundersøgelser med gentagen dosis af passende varighed. Varigheden af behandlingen før parring i den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation har derfor til formål at detektere virkninger på funktionsændringer, der kan forstyrre parringsadfærd og befrugtning. Behandlingen før parring skal være tilstrækkeligt lang til at opnå ligevægtseksponeringsbetingelser hos P-hanner og -hunner. En to uger lang behandling før parring anses for passende for begge køn i de fleste tilfælde. For hunner dækker dette tre til fire fulde brunstcyklusser og bør være tilstrækkeligt til at detektere evt. skadevirkninger på cykliciteten. For hanner svarer det til den tid, der er nødvendig for epididymal transit af modnende spermatozoer, og bør give mulighed for at detektere posttestikulære virkninger på spermaen (under de sidste stadier af spermiation og spermamodning i epididymis) ved parring. Ved testens afslutning, når tidspunkterne fastsættes for histopatologisk undersøgelse af testikler og epididymis og analyse af spermaparametre, vil P- og F_1-hannerne have været eksponeret i mindst én hel spermatogen proces ((6) (7) (8) (9) og OECD's vejledning 151 (40)).

27. Eksponeringsscenarierne for hanner før parring kan justeres, hvis testikeltoksicitet (forringelse af spermatogenesen) eller virkninger på spermaintegritet og -funktion er blevet klart identificeret i tidligere undersøgelser. På samme måde kan kendte virkninger af testkemikaliet på brunstcyklussen og dermed befrugtningsdygtigheden for hunner begrunde andre eksponeringsscenarier før parring. I særlige tilfælde kan det være acceptabelt, at behandling af P-hunner først indledes, efter at der er opnået et spermapositivt smear (se OECD's vejledning 151 (40)).

28. Når doseringsperioden før parring er fastlagt, behandles dyrene kontinuerligt med testkemikaliet syv dage om ugen indtil obduktion. Alle dyr doseres ved samme metode. Dosering fortsætter i den to uger lange parringsperiode og for P-hunner gennem drægtighed og laktation indtil afslutningen af testen efter fravænning. Hanner behandles på samme måde indtil testens afslutning på det tidspunkt, hvor F_1-dyrene er vænnet fra. Til obduktion prioriteres hunnerne højest, idet de obduceres på samme laktationsdag. Obduktion af hanner kan spredes over et større antal dage alt efter laboratoriets faciliteter. Medmindre den direkte dosering af udvalgte F_1-hanner og

-hunner er iværksat i laktationsperioden, påbegyndes den ved fravænning og fortsætter indtil planlagt obduktion alt efter kohortetilordningen.

29. Når kemikalier indgives via foder eller drikkevand, er det vigtigt at sikre, at de pågældende mængder af testkemikaliet ikke griber forstyrrende ind i den normale ernærings- eller vandbalance. Når testkemikaliet indgives i foderet, kan der bruges enten en konstant foderkoncentration (ppm) eller en konstant dosisstørrelse i forhold til dyrets kropsvægt. Den valgte mulighed angives.

30. Indgives testkemikaliet ved sonde, må den indgivne væskemængde på én gang normalt ikke overskride 1 ml/100 g kropsvægt (0,4 ml/100 g kropsvægt er maksimum for olie, f.eks. majsolie). Hvis der ikke er tale om lokalirriterende eller ætsende kemikalier, hvis effekt sædvanligvis er værre ved højere koncentrationer, skal variabiliteten af testvolumenet minimeres gennem justering af koncentrationen, således at der sikres et konstant volumen ved alle dosisniveauer. Behandlingen indgives på samme tidspunkter hver dag. Dosis til hvert dyr baseres normalt på den seneste individuelle bestemmelse af kropsvægt og justeres mindst én gang om ugen for voksne hanner og voksne ikkedrægtige hunner og hver anden dag for drægtige hunner og F_1-dyr, når indgiften sker før fravænning, og i to uger efter fravænningen. Hvis TK-data viser en lav placentaoverførsel af testkemikaliet, kan man være nødt til at justere sondedosis i den sidste drægtighedsuge for at undgå at indgive en alt for toksisk dosis til moderdyret. På dagen for fødslen må hunner ikke behandles med sonde eller andre indgiftsformer, hvor dyret skal håndteres. Det er bedre at undlade indgift af testkemikaliet den dag frem for at forstyrre fødselsprocessen.

Parring

31. Hver P-hun anbringes sammen med en enkelt vilkårligt udvalgt ubeslægtet han fra samme dosisgruppe (1:1-parring), indtil der observeres evidens for kopulation, eller der er gået to uger. Hvis der ikke er hanner nok, f.eks. på grund af død inden parring, kan der parres en eller flere hanner, som allerede har været parret (1:1) med en anden hun/andre hunner, således at alle hunner parres. Dag 0 i drægtighedsperioden defineres som den dag, hvor evidens for parring bekræftes (der observeres vaginalprop eller sperma). Dyr adskilles snarest muligt, efter at evidens for kopulation er observeret. Hvis parring ikke er sket efter to uger, adskilles dyrene uden yderligere mulighed for parring. De parrede dyr skal være tydeligt identificeret i dataene.

Kuldstørrelse

32. På dag 4 efter fødslen standardiseres hvert kuld, ved at overskydende unger fjernes ved vilkårlig udvælgelse, således at hvert kuld kommer så tæt som muligt på at bestå af fem handyr og fem hundyr pr. kuld. Selektiv fjernelse af unger, f.eks. baseret på kropsvægt, er ikke hensigtsmæssig. Når antallet af han- eller hununger gør det umuligt at få fem af hvert køn i hvert kuld, er en delvis standardisering (f.eks. seks hanner og fire hunner) acceptabel.

Udvælgelse af unger til undersøgelser efter fravænning (se figur 1)

33. Ved fravænning (omkring PND 21) vælges unger fra alle tilgængelige kuld, op til 20 pr. dosis- og kontrolgruppe, til yderligere undersøgelser og beholdes indtil kønsmodning (medmindre tidligere test er påkrævet). Ungerne vælges vilkårligt, bortset fra at de, der tydeligvis er mindst (dyr med en kropsvægt over to standardafvigelser under den gennemsnitlige vægt for unger i det respektive kuld), ikke medtages, da de sandsynligvis ikke vil være repræsentative for behandlingsgruppen.

På PND 21 tilordnes de udvalgte F_1-unger vilkårligt til en af de tre kohorter af dyr, som følger:

kohorte 1 (1A og 1B) = reproduktions-/udviklingstoksicitetstest

kohorte 2 (2A og 2B) = udviklingsneurotoksicitetstest

kohorte 3 = udviklingsimmunotoksicitetstest.

Kohorte 1A: Én han og én hun/ét kuld/én gruppe (20/køn/gruppe): prioriteret udvælgelse til primær vurdering af virkninger på forplantningssystemer og af generel toksicitet.

Kohorte 1B: Én han og én hun/ét kuld/én gruppe (20/køn/gruppe): prioriteret udvælgelse til opfølgende vurdering af reproduktionsevnen ved at parre F_1-dyr ved vurdering (se OECD's vejledning 117 (39)) og for at få supplerende histopatologiske data i tilfælde af mistanke om reproduktions- eller hormonforstyrrende stoffer, eller når resultaterne fra kohorte 1A er usikre.

Kohorte 2A: I alt 20 unger pr. gruppe (10 hanner og 10 hunner pr. gruppe, én han eller én hun pr. kuld) tilordnes til neuroadfærdstest efterfulgt af neurohistopatologisk vurdering som voksne.

Kohorte 2B: I alt 20 unger pr. gruppe (10 hanner og 10 hunner pr. gruppe, én han eller én hun pr. kuld) tilordnes til neurohistopatologisk vurdering ved afvænning (PND 21 eller PND 22). Hvis antallet af dyr er utilstrækkeligt, skal der helst tilordnes dyr til kohorte 2A.

Kohorte 3: I alt 20 unger pr. gruppe (10 hanner og 10 hunner pr. gruppe, én pr. kuld, hvor det er muligt). Yderligere unger kan være nødvendige fra kontrolgruppen til at fungere som positive kontroldyr i det T-celleafhængige antistofresponsassay (TDAR) på PND 56 ± 3.

34. Skulle der være et utilstrækkeligt antal unger i et kuld til alle kohorter, er kohorte 1 vigtigst, da den kan udvides til at producere en F_2-generation. Ekstra unger kan tilordnes til alle kohorter i tilfælde af særlige hensyn, f.eks. hvis et kemikalie mistænkes for at være et stof med neurotoksisk, immunotoksisk eller reproduktionstoksisk virkning. Disse unger kan anvendes til undersøgelser på forskellige tidspunkter eller til evaluering af supplerende endepunkter. Unger, som ikke tilordnes til kohorter, vil blive underkastet klinisk-biokemiske målinger (pkt. 55) og makroskopisk obduktion (pkt. 68).

Anden parring af P-dyr

35. En anden parring anbefales normalt ikke for P-dyr, da man derved mister vigtige oplysninger om antallet af implantationssteder (og således data om den letale virkning efter implantation og perinatalt tab, som er indikatorer for et muligt teratogent potentiale) for det første kuld. Behovet for at kontrollere eller klarlægge en virkning hos eksponerede hunner kan opfyldes bedre ved at udvide undersøgelsen til at omfatte en parring af F_1-generationen. En anden parring af P-hanner med ubehandlede hunner er dog altid en mulighed for at tydeliggøre usikre resultater eller for yderligere at karakterisere fertilitetsvirkninger observeret ved den første parring.

OBSERVATIONER I LEVENDE LIVE

Kliniske observationer

36. For P- og de udvalgte F_1-dyr foretages der en generel klinisk observation én gang om dagen. Ved sondedosering skal tidspunktet for kliniske observationer ligge før og efter doseringen (for mulige tegn på toksicitet i forbindelse med maksimal plasmakoncentration). Relevante adfærdsændringer, tegn på vanskelig eller langvarig fødsel og alle tegn på toksicitet registreres. To gange dagligt og i weekenden én gang dagligt observeres alle dyr for svær toksicitet, morbiditet og mortalitet.

37. Endvidere foretages en mere detaljeret undersøgelse af alle P- og F_1-dyr (efter fravænning) én gang om ugen, hvilket passende kan ske i forbindelse med vejning af dyret, hvilket mindsker håndteringsstress. Observationerne foretages omhyggeligt og registreres under anvendelse af bedømmelsessystemer, som er defineret af testlaboratoriet. Det er vigtigt at sikre, at variationer i testbetingelserne er minimale. Observationerne rettes bl.a. mod ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet (f.eks. tåreflåd, piloerektion, pupilstørrelse, usædvanligt respirationsmønster). Tillige registreres ændringer i gang, kropsholdning og reaktion på håndtering såvel som forekomst af kloniske eller toniske bevægelser, stereotyp optræden (f.eks. overdreven soignering, stadig kredsen i cirkelbevægelser) eller mærkelig adfærd (f.eks. selvmutilation, baglæns gang).

Kropsvægt og foder-/vandindtagelse

38. P-dyr vejes den første doseringsdag og siden mindst én gang om ugen. Endvidere vejes diegivende P-dyr på de samme dage, som ungerne i deres kuld vejes (se pkt. 44). Alle F_1-dyr vejes individuelt ved fravænning (PND 21) og siden mindst én gang om ugen. Kropsvægten registreres også den dag, de når puberteten (når præputial separation eller vaginal åbning er afsluttet). Alle dyr vejes ved aflivning.

39. I løbet af undersøgelsen registreres foder- og vandindtagelse (såfremt testkemikaliet indgives i drikkevandet) mindst én gang om ugen den samme dag som vejningen af dyrets kropsvægt (undtagen i den periode, hvor dyrene er sammen). Foderindtagelsen for hvert bur med F_1-dyr registreres ugentligt og påbegyndes ved udvælgelsen til de respektive kohorter.

Brunstcyklusser

40. Foreløbig information om testkemikaliets virkninger på brunstcyklussen kan allerede være tilgængelig fra tidligere toksicitetsundersøgelser med gentagen dosis og kan bruges til udformning af en testkemikaliespecifik protokol til den udvidede reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation. Normalt vil vurderingen af brunstcyklus (ved vaginal cytologi) starte ved begyndelsen af behandlingsperioden og fortsætte, indtil parringen er bekræftet eller til afslutningen af den to uger lange parringsperiode. Hvis hunnerne er blevet screenet for normal brunstcyklus før behandlingen, er det nyttigt at fortsætte med smearing, når behandlingen starter, men hvis man er bekymret for uspecifikke virkninger ved behandlingens begyndelse (såsom en markant reduktion i foderindtagelse i begyndelsen), kan dyrene få lov til at tilpasse sig behandlingen i op til to uger før begyndelsen af den tougers smearingperiode, der fører til parringen. Udvides hunnens behandlingsperiode på denne måde (dvs. til en fireugers behandling før parring), bør man tænke på at købe dyrene yngre og udvide hannens behandlingsperiode før parring. Udtagning af celleprøve fra vagina/cervix skal ske forsigtigt for at undgå forstyrrelse af slimhinden med efterfølgende fremkaldelse af pseudodrægtighed (10) (11).

41. Vaginalt smear undersøges dagligt for alle F_1-hunner i kohorte 1A efter indtræden af vaginalåbning, og indtil det første forhornede smear er registreret, for at bestemme tidsintervallet mellem disse to hændelser. Brunstcyklusser for alle F_1-hunner i kohorte 1A overvåges også i en periode på to uger fra omkring PND 75. Skulle parring af F_1-generationen blive nødvendig, følges desuden den vaginale cytologi i kohorte 1B fra tidspunktet for parring, indtil der er evidens for parringen.

Parring og drægtighed

42. Ud over standardendepunkter (f.eks. kropsvægt, foderindtagelse, kliniske observationer, herunder mortalitets-/morbiditetskontroller) registreres datoerne for parring, datoen for insemination og datoen for fødsel, og det prækoitale interval (parring til insemination) og drægtighedens varighed (insemination til fødsel) beregnes. P-hunner undersøges omhyggeligt på tidspunktet for forventet fødsel for evt. tegn på dystoki. Evt. abnormiteter i redeadfærd eller yngelpleje registreres.

43. Den dag, fødslen går i gang, er laktationsdag 0 (LD 0) for moderdyret og postnatal dag 0 (PND 0) for afkommet. Alternativt kan alle sammenligninger også baseres på postkoital tid for ikke at sammenblande postnatale udviklingsdata og forskelle i drægtighedens varighed, men tidspunktet for fødslen skal dog også registreres. Dette er særligt vigtigt, når testkemikaliet påvirker drægtighedens varighed.

Parametre for afkom

44. Hvert kuld undersøges snarest muligt efter fødslen (PND 0 eller 1) for at fastslå ungernes antal og køn, dødfødte, levendefødte og tilstedeværelse af alvorlige abnormiteter (eksternt synlige abnormiteter såsom ganespalte, subkutane blødninger, anormal hudfarve eller -tekstur, tilstedeværelse af navlestreng, manglende mælk i maven, tilstedeværelse af indtørrede sekreter). Desuden skal den første kliniske undersøgelse af nyfødte omfatte en kvalitativ vurdering af kropstemperatur, aktivitetsstatus og reaktion på håndtering. Unger, som findes døde på PND 0 eller senere, undersøges for mulige defekter og dødsårsag. Levende unger tælles og vejes individuelt på PND 0 eller PND 1 og regelmæssigt herefter, f.eks. som minimum på PND 4, 7, 14 og 21. Kliniske undersøgelser i forhold til dyrenes alder gentages, når afkommet vejes, eller oftere, hvis der er gjort konkrete fund ved fødslen. Tegn, der skal

noteres, omfatter, men er ikke begrænset til, ydre abnormiteter, ændringer i hud, pels, øjne, slimhinder, forekomst af sekretion og ekskretion samt autonom aktivitet. Tillige registreres ændringer i gang, kropsholdning og reaktion på håndtering såvel som forekomsten af kloniske eller toniske bevægelser, stereotyp optræden eller mærkelig adfærd.

45. Hver unges anogenitale afstand (AGD) måles mindst én gang fra PND 0 til PND 4. Ungens kropsvægt registreres den dag, AGD måles, og AGD normaliseres til et mål for ungens størrelse, helst kubikroden af kropsvægten (12). Tilstedeværelsen af brystvorter/areolae hos hanunger kontrolleres på PND 12 eller 13.

46. Alle udvalgte F_1-unger vurderes dagligt for balano-præputial separation eller åbning af vagina for henholdsvis hanner og hunner, og vurderingen begynder før den dag, hvor disse endepunkter forventes nået, for at konstatere, om kønsmodningen indtræder tidligt. Evt. abnormiteter i kønsorganer såsom vedvarende vaginaltråd, hypospadia eller spaltet penis noteres. F_1-dyrs kønsmodenhed sammenlignes med fysisk udvikling ved at bestemme alder og kropsvægt ved balano-præputial separation eller åbning af vagina for henholdsvis hanner og hunner (13).

Vurdering af potentiel udviklingsneurotoksicitet (kohorte 2A og 2B)

47. 10 hanner og 10 hunner i kohorte 2A og 10 hanner og 10 hunner i kohorte 2B fra hver behandlingsgruppe (for hver kohorte: én han eller én hun pr. kuld, idet alle kuld repræsenteres af mindst én vilkårligt udvalgt unge) anvendes til neurotoksicitetsvurderinger. Kohorte 2A-dyr underkastes auditiv startle, »functional observational battery«, motorisk aktivitet (se pkt. 48-50) og neuropatologiske vurderinger (se pkt. 74-75). Man skal bestræbe sig på at sikre, at variationer i alle testbetingelser er minimale og ikke systematisk relateres til behandlingen. Blandt variabler, som kan påvirke adfærden, er lydstyrke (f.eks. intermitterende støj), temperatur, luftfugtighed, belysning, lugte, tidspunkt på dagen og forstyrrelser fra omgivelserne. Resultater af neurotoksicitetsassays fortolkes i forhold til relevante tidligere kontrolreferenceintervaller. Kohorte 2B-dyr anvendes til neuropatologisk vurdering på PND 21 eller PND 22 (se pkt. 74-75).

48. En auditiv startle-test udføres på PND 24 (± 1 dag) under anvendelse af dyr i kohorte 2A. Testdagen afbalanceres med behandlings- og kontrolgrupper. Hver session består af 50 forsøg. Ved udførelse af den auditive startle-test bestemmes den gennemsnitlige responsamplitude på hver blok a 10 forsøg (fem blokke a 10 forsøg), idet testbetingelserne optimeres, så der skabes tilvænning inden for den enkelte session. Disse procedurer skal være i overensstemmelse med testmetode B.53 (35).

49. På et passende tidspunkt mellem PND 63 og PND 75 underkastes kohorte 2A-dyrene et »functional observational battery« og en automatiseret test af motorisk aktivitet. Disse procedurer skal være i overensstemmelse med testmetode B.43 (33) og B.53 (35). »Functional observational battery« omfatter en grundig beskrivelse af forsøgsdyrets udseende, adfærd og funktionsmæssige integritet. Dette vurderes gennem observationer i dyrets eget bur, efter fjernelse til et standardareal til observation (åbent felt), hvor dyret bevæger sig frit, og gennem manipulationstest. Progressionen går fra den mindst til den mest interaktive test. En liste over målinger er anført i tillæg 1. Alle dyr observeres nøje af uddannede observatører, som ikke kender dyrenes behandlingsstatus og følger standardiserede procedurer for at minimere variabilitet, som skyldes observatørerne. Hvor det er muligt, anbefales det, at den samme observatør vurderer dyrene i en given test. Hvis det ikke er muligt, skal det påvises, at der er en vis pålidelighed mellem observatørerne. For hver parameter i gruppen af adfærdstest anvendes der eksplicitte operationelt definerede bedømmelseskriterier og -skalaer. Om muligt udvikles der objektive kvantitative mål for observationsendepunkter, der omfatter subjektiv rangordning. Med hensyn til motorisk aktivitet testes hvert dyr individuelt. Testsessionen skal være lang nok til at påvise kontroldyrenes tilvænning inden for den enkelte session. Motorisk aktivitet overvåges af et automatisk aktivitetsregistrerende apparat, som skal kunne afsløre både stigninger og fald i aktiviteten (dvs. at referenceaktiviteten som målt af anordningen ikke må være så lav, at fald ikke afsløres, og heller ikke så høj, at aktivitetsstigninger ikke registreres). Hver anordning testes efter standardprocedurer for så vidt muligt at sikre operationens pålidelighed på tværs af anordninger og dage. Så vidt muligt skal behandlingsgrupperne være ligeligt fordelt over anordningerne. Behandlingsgrupper udlignes på tværs af testgange for at undgå sammenblanding af cirkadiske aktivitetsrytmer.

50. Såfremt eksisterende information viser behov for andre funktionstest (f.eks. sensorisk, social, kognitiv), integreres disse uden at skade integriteten af de øvrige evalueringer, som foretages i undersøgelsen. Hvis testen udføres med de samme dyr, som bruges til standard auditiv startle, functional observational battery og test af motorisk

aktivitet, fastsættes der forskellige test for at minimere risikoen for at skade integriteten af disse test. Supplerende procedurer kan være særligt nyttige, når empiriske observationer, forventede virkninger eller virkningsmekanisme/virkemåde peger på neurotoksicitet af en bestemt art.

Vurdering af potentiel udviklingsimmunotoksicitet (kohorte 3)

51. På PND 56 (± 3 dage) anvendes 10 hanner og 10 hunner i kohorte 3 fra hver behandlingsgruppe (én han eller én hun pr. kuld, alle kuld repræsenteret med mindst én unge, vilkårligt udvalgt) i et T-celleafhængigt antistofrespons-sassay, dvs. den primære IgM-antistofrespons på et T-celleafhængigt antigen såsom røde blodlegemer fra får (Sheep Red Blood Cells, SRBC) eller Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), i overensstemmelse med aktuelle immunotoksicitetstestprocedurer (14) (15). Reaktionen kan evalueres ved at tælle specifikke plaquedannende celler (plaque-forming cells — PFC) i milten eller ved at bestemme SRBC- eller KLH-specifikt IgM-antistoftiter i serummet gennem ELISA ved maksimal respons. Reaktionerne topper typisk fire (PFC-respons) eller fem (ELISA) dage efter intravenøs immunisering. Hvis den primære antistofrespons analyseres ved at tælle plaquedannende celler, er det tilladt at evaluere undergrupper af dyr på forskellige dage, forudsat at tidspunkterne for undergruppens immunisering og aflivning er fastsat således, at PFC'er tælles ved den maksimale respons, undergrupperne indeholder lige mange han- og hununger fra alle dosisgrupper, herunder kontrolgrupper, og undergrupperne evalueres ved omtrent samme alder efter fødslen (PND). Eksponering for testkemikaliet vil fortsætte, indtil dagen før miltene indsamles med henblik på PFC-respons eller serum til ELISA-assayet.

Opfølgende vurdering af potentiel reproduktionstoksicitet (kohorte 1B)

52. Kohorte 1B-dyr kan fastholdes i behandling ud over PND 90 og bruges til avl for at få en F_2-generation, hvis det er nødvendigt. Hanner og hunner fra samme dosisgruppe anbringes sammen (idet det undgås at parre søskende) i op til to uger fra eller efter PND 90, men ikke efter PND 120. Procedurerne er de samme som for P-dyr. Dog kan det på grundlag af »weight of evidence« være tilstrækkeligt at aflive kuldene på PND 4 i stedet for at følge dem til fravænning eller senere.

AFSLUTTENDE OBSERVATIONER

Klinisk biokemi/hæmatologi

53. Systemiske virkninger overvåges hos P-dyrene. Fastende blodprøver fra et bestemt sted tages fra 10 vilkårligt udvalgte P-hanner og -hunner pr. dosisgruppe ved undersøgelsens afslutning, opbevares under passende betingelser og underkastes delvis eller fuldstændig hæmatologisk undersøgelse, klinisk-biokemisk undersøgelse, assay af T4 og TSH eller andre undersøgelser i henhold til den kendte virkningsprofil for testkemikaliet (se OECD's vejledning 151 (40)). Følgende hæmatologiske parametre undersøges: hæmatokrit, hæmoglobinkoncentration, erythrocyttælling, total og differential leucocyttælling, blodpladetælling og koaguleringstid/-evne. Undersøgelser af plasma eller serum omfatter: glukose, total cholesterol, urinstof, kreatinin, total protein og albumin, mindst to enzymer, hvis forekomst kan være tegn på hepatocellulære effekter (f.eks. alanin aminotransferase, aspartat aminotransferase, alkalisk phosphatase, gamma glutamyl transpeptidase og sorbitol dehydrogenase). Målinger af yderligere enzymer og galdesyrer kan under visse omstændigheder give nyttige oplysninger. Der kan desuden tages blodprøver fra alle dyr, som opbevares til mulig analyse på et senere tidspunkt for yderligere at afklare usikre virkninger eller generere interne eksponeringsdata. Såfremt der ikke er planer om en anden parring af P-dyr, tages blodprøverne lige før eller som en del af proceduren ved den fastsatte aflivning. Hvis dyr beholdes, tages blodprøver, et par dage før dyrene parres for anden gang. Medmindre eksisterende data fra undersøgelser med gentagen dosis viser, at parameteren ikke påvirkes af testkemikaliet, udføres urinanalyse forud for afslutningen af undersøgelsen, og følgende parametre evalueres: udseende, volumen, osmolalitet eller specifik vægtfylde, pH, protein, glukose, blod og blodceller, cellerester. Urin kan også opsamles for at overvåge udskillelsen af testkemikaliet og/eller metabolitter.

54. Systemiske virkninger overvåges også hos F_1-dyrene. Fastende blodprøver fra et bestemt sted tages fra 10 vilkårligt udvalgte kohorte 1A-hanner og -hunner pr. dosisgruppe ved afslutningen, opbevares under passende betingelser og underkastes standardklinisk-biokemisk undersøgelse, herunder vurdering af serumniveauer for skjoldbruskkirtelhormoner (T4 og TSH), hæmatologisk undersøgelse (total og differential leucocyttælling plus erythrocyttælling) og urinanalyse.

55. Overskydende unger på PND 4 underkastes makroskopisk obduktion, og det overvejes at måle serumthyroidhormonkoncentrationer (T4). Om nødvendigt kan neonatalt (PND 4) blod samles efter kuld til biokemiske undersøgelser/thyroidhormonanalyser. Blod samles også til T4- og TSH-analyse fra fravænnede individer, som underkastes makroskopisk obduktion på PND 22 (F_1-unger, der ikke er valgt til kohorter).

Spermaparametre

56. Spermaparametre måles hos alle P-generationshanner, medmindre eksisterende data viser, at spermaparametrene er upåvirkede i en 90-dagesundersøgelse. Undersøgelse af spermaparametre udføres for alle kohorte 1A-hanner.

57. Ved afslutningen registreres testis- og epididymis-vægt for alle P- og F_1- (kohorte 1A) hanner. Mindst én testis og én epididymis udtages til histopatologisk undersøgelse. De resterende eksemplarer af epididymis anvendes til tælling af spermiebeholdning i cauda epididymidis (16) (17). Endvidere opsamles sperma fra cauda epididymidis (eller vas deferens) efter metoder, som minimerer skaden, til vurdering af spermiemotilitet og -morfologi (18).

58. Spermiemotilitet kan enten vurderes straks efter aflivning eller registreres til senere analyse. Procentdelen af fremadbevægelige (progressivt motile) spermier bestemmes enten subjektivt eller objektivt gennem computerassisteret motilitetsanalyse (19) (20) (21) (22) (23) (24). Til bedømmelse af spermiemorfologi undersøges en spermaprøve fra epididymis (eller vas deferens) som fikserede eller våde præparater (25) og med mindst 200 spermatozoer pr. prøve klassificeret som enten normale (både hoved og midterstykke/hale ser normale ud) eller anormale. Som eksempel på morfologiske spermieabnormiteter kan nævnes sammensmeltning, isoleret hoved og misdannet hoved og/eller hale (26). Misdannede eller store spermahoveder kan være tegn på defekter i spermiationen.

59. Hvis spermaprøver fryses, udstrygninger fikseres, og billeder til spermamotilitetsanalyse registreres ved obduktionen (27), kan efterfølgende analyse begrænses til hanner i kontrol- og højdosisgrupperne. Observeres der imidlertid behandlingsrelaterede virkninger, vurderes de lavere dosisgrupper også.

Makroskopisk obduktion

60. Ved testens afslutning eller for tidlig død obduceres alle P- og F_1-dyr og undersøges makroskopisk for evt. strukturabnormiteter eller patologiske forandringer. Særlig opmærksomhed rettes mod kønsorganerne. Unger, som aflives af humane grunde i moribund tilstand, samt døde unger registreres og undersøges, når de ikke er opløst, for evt. defekter og/eller dødsårsag og præserveres.

61. For voksne P- og F_1-hunner undersøges et vagina-smear på obduktionsdagen for at bestemme stadiet i brunstcyklussen og muliggøre korrelation med den histopatologiske undersøgelse af kønsorganerne. På alle P-hunner (og evt. F_1-hunner) undersøges uterus på en måde, som ikke vanskeliggør histopatologisk bedømmelse, for tilstedeværelse af og antal implantationssteder.

Organvægt og vævspræservering — P- og voksne F_1-dyr

62. Ved testens afslutning bestemmes kropsvægt og vådvægt af alle nedenfor anførte organer fra alle P-dyr og alle voksne F_1-dyr fra relevante kohorter (anført nedenfor) snarest muligt efter dissektion for at undgå udtørring. Disse organer præserveres herefter under passende betingelser. Medmindre andet er anført, kan parrede organer vejes enkeltvis eller sammen i overensstemmelse med det udførende laboratoriums sædvanlige praksis.

— Uterus (med æggeledere og cervix), ovarier

— testes, epididymides (total og cauda for prøverne, som anvendes til spermatælling)

— prostata (dorsolateral og ventral del sammen). Man skal være forsigtig ved rensning af prostatakomplekset for at undgå at punktere de væskefyldte vesiculae seminales. I tilfælde af en behandlingsrelateret virkning på den samlede prostatavægt dissekeres de dorsolaterale og ventrale segmenter omhyggeligt efter fiksering og vejes separat

— vesiculae seminales med prostata anterior og deres væsker (som én enhed)

— hjerne, lever, nyrer, hjerte, milt, thymus, hypofyse, skjoldbruskkirtel (efter fiksering), binyrer og kendte målorganer eller -væv.

63. Ud over de her anførte organer præserveres prøver af perifer nerve, muskel, rygmarv, øje plus synsnerve, mavetarmkanal, urinblære, lunge, spiserør (med vedhæftet skjoldbruskkirtel og biskjoldbruskkirtel), knoglemarv, vas deferens (hanner), brystkirtler (hanner og hunner) og vagina under passende betingelser.

64. Alle organer fra kohorte 1A-dyr vejes og præserveres til histopatologisk undersøgelse.

65. Til undersøgelse af immunotoksiske virkninger fremkaldt før eller efter fødslen underkastes 10 hanner og 10 hunner fra kohorte 1A fra hver behandlingsgruppe (én han og én hun pr. kuld, idet alle kuld repræsenteres med mindst én vilkårligt udvalgt unge) følgende undersøgelser:

— vejning af lymfeknuder i tilknytning til og med afstand til eksponeringsvejen (ud over vejningen af binyrerne, thymus og milt, der allerede er udført for alle kohorte 1A-dyr)

— analyse af splenisk lymfocytsubpopulation (CD4+ og CD8+ T-lymfocytter, B-lymfocytter og naturlige dræberceller) under anvendelse af halvdelen af milten, idet den anden halvdel af milten præserveres til histopatologisk bedømmelse.

En analyse af spleniske lymfocytsubpopulationer i ikkeimmuniserede dyr (kohorte 1A) vil afgøre, om eksponeringen hænger sammen med et skifte i den immunologiske ligevægtsfordeling af »hjælper«- (CD4+) eller cytotoksiske (CD8+) thymusderiverede lymfocytter eller naturlige dræber- (NK) celler (hurtige reaktioner på neoplastiske celler og patogener).

66. Følgende organer fra kohorte 1B-dyr vejes, og tilsvarende væv præserveres til bloktrinnet:

— vagina (ikke vejet)

— uterus med cervix

— ovarier

— testes (mindst én)

— epididymides

— vesiculae seminales og prostata anterior

— prostata

— hypofyse

— identificerede målorganer.

Der foretages histopatologisk undersøgelse i kohorte 1B, hvis resultaterne fra kohorte 1A er usikre, eller i tilfælde af mistanke om reproduktions- eller hormonforstyrrende stoffer.

67. Kohorte 2A og 2B: Udviklingsneurotoksicitetstest (PND 21 eller PND 22 og voksent afkom). Kohorte 2A-dyr aflives efter adfærdstest med registrering af hjernevægt og fuldstændig neurohistopatologisk undersøgelse med henblik på neurotoksicitetsvurdering. Kohorte 2B-dyr aflives på PND 21 eller PND 22 med registrering af hjernevægt og mikroskopisk undersøgelse af hjernen med henblik på neurotoksicitetsvurdering. Perfusionsfiksering er nødvendig for kohorte 2A-dyr og valgfri for kohorte 2B-dyr, jf. testmetode B.53 (35).

Organvægt og vævspræservering — fravænnede F_1-dyr

68. Unger, som ikke er udvalgt til kohorter, herunder små uudviklede unger, aflives efter fravænning på PND 22, medmindre resultaterne viser behov for yderligere undersøgelser i levende live. Aflivede unger underkastes makroskopisk obduktion, herunder en vurdering af kønsorganerne, jf. pkt. 62 og 63. For op til 10 unger pr. køn pr. gruppe fra så mange kuld som muligt vejes hjerne, milt og thymus og opbevares under passende betingelser. Endvidere kan brystvæv for disse han- og hununger præserveres til videre mikroskopisk analyse ([1]) (se OECD's vejledning 151 (40)). Større anomalier og målvæv gemmes til evt. histologisk undersøgelse.

([1]) Forskning har vist, at brystkirtlen, især under udviklingen i de tidlige livsstadier, er et følsomt endepunkt for østrogenaktivitet. Det anbefales at medtage endepunkter, som involverer brystkirtler fra unger af begge køn, i denne testmetode, når den valideres.

Histopatologi — P-dyr

69. En fuldstændig histopatologisk undersøgelse af alle organer anført i pkt. 62 og 63 udføres for alle P-dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. De organer, som udviser behandlingsrelaterede forandringer, undersøges ligeledes for alle dyr fra lavdosisgrupperne som led i fastsættelsen af NOAEL. Derudover omfatter den histopatologiske undersøgelse kønsorganerne fra alle dyr, som mistænkes for nedsat fertilitet, fordi de f.eks. ikke har været i stand til at parre sig, undfange, besvangre eller føde rask afkom, eller hvis brunstcyklus, spermietal, -motilitet eller -morfologi var påvirket, samt alle makroskopiske forandringer.

Histopatologi — F_1-dyr

Kohorte 1-dyr

70. En fuldstændig histopatologisk undersøgelse af organerne anført i pkt. 62 og 63 udføres for alle voksne kohorte 1-dyr i højdosis- og kontrolgrupperne. Alle kuld skal være repræsenteret med mindst én unge pr. køn. De organer og væv, som udviser behandlingsrelaterede forandringer og alle makroskopiske læsioner, undersøges ligeledes for alle dyr fra lavdosisgrupperne som led i fastsættelsen af NOAEL. Til bedømmelse af virkninger fremkaldt før eller efter fødslen på lymfoide organer foretages også en histopatologisk undersøgelse af indsamlede lymfeknuder og knoglemarv fra 10 hanner og 10 hunner i kohorte 1A ved siden af den histopatologiske undersøgelse af thymus, milt og binyrer, som allerede er udført på alle 1A-dyr.

71. Der foretages en histopatologisk undersøgelse af reproduktions- og endokrint væv fra alle kohorte 1B-dyr behandlet til bloktrinnet som beskrevet i pkt. 66 i tilfælde af mistanke om reproduktions- eller hormonforstyrrende stoffer. Er resultaterne fra kohorte 1A usikre, foretages også en histologisk undersøgelse af kohorte 1B.

72. Ovarier fra voksne hunner skal indeholde primordial- og voksende follikler foruden corpora lutea. Derfor sigter den histopatologiske undersøgelse mod en kvantitativ vurdering af primordial- og voksende follikler foruden corpora lutea i F_1-hunner. Antallet af dyr, valg af ovariesnit og størrelsen af prøvesnit skal være statistisk tilpasset den anvendte vurderingsmetode. En follikeltælling kan først foretages på kontrol- og højdosisdyr, og ved skadevirkning hos sidstnævnte undersøges lavere dosisgrupper. Undersøgelsen skal omfatte en optælling af primordialfollikler, hvilket kan kombineres med optælling af små voksende follikler, med henblik på sammenligning af ovarierne i behandlings- og kontrolgrupper (se OECD's vejledning 151 (40)). Vurdering af corpora lutea foretages parallelt med test for brunstcyklus, så der kan tages hensyn til cyklusstadiet i vurderingen. Æggeleder, uterus og vagina undersøges for passende organtypisk udvikling.

73. Detaljerede histopatologiske undersøgelser af testiklerne foretages på F_1-hanner for at identificere behandlingsrelaterede virkninger på testisdifferentiering og -udvikling samt på spermatogenesen (38). Når det er muligt, undersøges snit af rete testis. Caput, corpus og cauda fra epididymis og vas deferens undersøges for passende organtypisk udvikling og for de krævede parametre for P-hanner.

Kohorte 2-dyr

74. Neurohistopatologiske undersøgelser foretages for alle højdosis- og kontroldyr i kohorte 2A pr. køn efter fuldførelse af neuroadfærdstest (efter PND 75, men ikke efter PND 90). Histopatologisk undersøgelse af hjernen foretages for alle højdosis- og kontroldyr i kohorte 2B pr. køn på PND 21 eller PND 22. De organer eller væv, som udviser behandlingsrelaterede forandringer, skal ligeledes undersøges for dyr fra lavere dosisgrupper som led i fastsættelsen af NOAEL. For kohorte 2A- og 2B-dyr undersøges mange snit fra hjernen, så det er muligt at undersøge bulbus olfactorius, cortex cerebralis, hippocampus, basalganglier, thalamus, hypothalamus, midterhjernen (tectum, tegmentum og pedunculus cerebri), hjernestamme og cerebellum. Kun for kohorte 2A undersøges øjne (retina og synsnerve) og prøver af perifer nerve, muskel og rygmarv. Alle neurohistologiske procedurer skal være i overensstemmelse med testmetode B.53 (35).

75. Morfometriske (kvantitative) vurderinger foretages på repræsentative områder af hjernen (homologe snit nøje udvalgt på grundlag af pålidelige mikroskopiske kendetegn) og kan omfatte lineære målinger og/eller arealmålinger af specifikke hjerneregioner. Der tages mindst tre på hinanden følgende snit ved hvert kendetegn (niveau) for at vælge det mest homologe og repræsentative snit for det specifikke hjerneområde, der skal vurderes. Neuropatologen skal udvise passende dømmekraft med hensyn til, om snit forberedt til måling er homologe med andre i

prøvesættet og derfor egnede til indgå i det, eftersom især lineære målinger kan ændre sig over en relativt kort afstand (28). Snit, som ikke er homologe, bruges ikke. Målet er at udtage prøver fra alle dyr, der er udtaget til det formål (10/køn/dosisniveau), men mindre antal kan dog stadig være tilstrækkeligt. Imidlertid vil prøver fra færre end seks dyr/køn/dosisniveau normalt ikke blive anset for tilstrækkeligt til denne testmetodes formål. Stereologi kan anvendes til at identificere behandlingsrelaterede virkninger på parametre såsom volumen eller celleantal til bestemte neuroanatomiske områder. I forbindelse med alle aspekter af præpareringen af vævsprøver, fra vævsfiksering over dissektion af vævsprøver og vævspræparering til farvning på objektglas, følges et afbalanceret design, således at hver batch indeholder repræsentative prøver fra hver dosisgruppe. Når der skal bruges morfometriske eller stereologiske analyser, indlejres hjernevævet i et passende medium ved alle dosisniveauer samtidig for at undgå de skrumpningsartefakter, der kan optræde i forbindelse med langvarig opbevaring i fiksativ.

RAPPORTERING

Data

76. Data rapporteres individuelt og opsummeres i tabelform. For hver testgruppe og hver generation rapporteres følgende, hvor det er relevant: antal dyr ved testens begyndelse, antal dyr fundet døde under testen eller aflivet humant, tidspunkt for død eller human aflivning, antal frugtbare dyr, antal drægtige hunner, antal hunner, som har født et kuld, og antal dyr, der viser tegn på toksicitet. En beskrivelse af toksiciteten samt tidspunktet for de toksiske virkningers indtræden, varighed og sværhedsgrad medtages også.

77. Numeriske resultater vurderes efter en relevant og accepteret statistisk metode. De statistiske metoder vælges som en del af undersøgelsesdesignet og skal på passende vis behandle ikkenormale data (f.eks. optællingsdata), censurerede data (f.eks. begrænset observationstid), ikke uafhængige (f.eks. kuldeffekter og gentagne målinger) samt ulige varianser. Generaliserede lineære blandede modeller og dosisresponsmodeller dækker en bred klasse af analytiske værktøjer, som kan være relevante for data genereret under denne testmetode. Rapporten skal indeholde tilstrækkelig information om analysemetoden og det anvendte computerprogram, til at en uafhængig rapportør/statistiker kan vurdere/revurdere analysen.

Vurdering af resultater

78. Fundene vurderes med hensyn til de observerede virkninger, bl.a. obduktion og mikroskopiske fund. Vurderingen omfatter sammenhængen — eller manglen herpå — mellem dosis og tilstedeværelse, forekomst og sværhedsgrad af anomalier, bl.a. makroskopiske læsioner. Målorganer, fertilitet, kliniske anomalier, reproduktions- og ynglepræstationer, ændringer i kropsvægt, mortalitet og evt. andre toksiske eller udviklingsmæssige virkninger vurderes også. Særlig opmærksomhed rettes mod kønsspecifikke forandringer. Testkemikaliets fysisk-kemiske egenskaber og evt. TK-data, herunder placentaoverførsel og mælkeudskillelse, inddrages i vurderingen af testresultaterne.

Testrapport

79. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger, der er fremkommet i denne undersøgelse fra P- og F_1-dyr samt F_2-dyr (hvor det er relevant).

Testkemikalie

— alle relevante tilgængelige oplysninger om testkemikaliets kemiske, toksikokinetiske og toksikodynamiske egenskaber

— identifikationsoplysninger

— renhed.

Evt. vehikel

— begrundelse for valg af vehikel (hvis det er andet end vand).

Forsøgsdyr

— anvendt art/stamme

— dyrenes antal, alder og køn

— oprindelse, miljøbetingelser, kost, redematerialer osv.

— de enkelte dyrs vægt ved testens begyndelse

— vaginaludstrygning for P-hunner før behandlingens påbegyndelse (hvis der indsamles data på det tidspunkt)

— parringsoptegnelser for P-generationen med angivelse af, hvilke hanner og hunner der er parret med hinanden, og parringssucces

— optegnelser over, hvilket kuld voksne F_1-generationsdyr er fra.

Testbetingelser

— rationale for valg af dosisniveau

— oplysninger om testkemikaliets formulering/fodertilberedning, opnåede koncentrationer

— tilberedningens stabilitet og homogenitet i vehikel eller bærer (f.eks. kost, drikkevand), i blod og/eller mælk under anvendelsesbetingelserne og opbevaring mellem anvendelser

— oplysninger om indgift af testkemikaliet

— omregning af testkemikaliets koncentration (ppm) i foder/drikkevand til faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag), hvis det er relevant

— oplysninger om foder- og vandkvalitet (herunder kostsammensætning, hvis oplysningerne foreligger)

— detaljeret beskrivelse af randomiseringsprocedurer for udvælgelse af unger til aflivning og tilordning af unger til testgrupper

— miljøbetingelser

— liste over forsøgsmedarbejdere, bl.a. uddannelse.

Resultater (resumé og individuelle data efter køn og dosis)

— foderindtagelse, evt. vandindtagelse, foderudnyttelse (kropsvægtforøgelse pr. gram indtaget foder bortset fra perioden, hvor dyrene har været sammen, og under laktation) og indtagelse af testkemikalie (for indgift i foder/drikkevand) for P- og F_1-dyr

— absorptionsdata (evt.)

— kropsvægtdata for P-dyr

— kropsvægtdata for udvalgte F_1-dyr efter fravænning

— dødstidspunkt under testen, eller hvorvidt dyrene overlevede til undersøgelsens afslutning

— art, alvor og varighed af det klinisk observerede (om det observerede er reversibelt)

— data om hæmatologiske og klinisk-kemiske undersøgelser samt urinanalyse, bl.a. TSH og T4

— fænotypisk analyse af miltceller (T-, B-, NK-celler)

— knoglemarvens cellularitet

— data om toksisk respons

— antal P- og F_1-hunner med normal eller anormal brunstcyklus og cyklusvarighed

— tid til parring (prækoitalt interval, antal dage mellem den dag, dyrene sættes sammen, og den faktiske parring)

— toksiske eller andre virkninger på reproduktion, herunder antal og procentdele dyr, som fuldførte parring, drægtighed, fødsel og laktation af hanner, der fremkaldte drægtighed, af hunner med tegn på dystoki/langvarig eller vanskelig fødsel

— varighed af drægtighed og evt. fødsel

— antal implantater, kuldstørrelse og procentdel hanunger

— antal og procentdel postimplantationstab, levende fødsler og dødfødsler

— vægtdata for kuld og unger (hanner, hunner og begge), antal små uudviklede unger, hvis de er optalt

— antal unger med makroskopisk synlige abnormiteter

— toksiske virkninger på afkom, postnatal vækst, levedygtighed osv.

— data vedrørende fysiske kendetegn hos unger og andre data vedrørende den postnatale udvikling

— data om F_1-dyrenes kønsmodning

— i det omfang det er relevant, data vedrørende iagttagelser af funktioner hos unger og voksne

— kropsvægt ved aflivning og absolut og relativ organvægt for P-dyr og voksne F_1-dyr

— obduktionsfund

— detaljeret beskrivelse af alle histopatologiske fund

— totalt antal spermier i cauda epididymis, procentdel progressivt motile spermier, procentdel morfologisk normale spermier og procentdel spermier med hver af de fundne abnormiteter for P- og F_1-hanner

— antal follikler i P- og F_1-hunners ovarier og deres modningsstadie, hvor det er relevant

— optælling af corpora lutea i F_1 -hunners ovarier

— statistisk behandling af resultaterne, når det er relevant.

Kohorte 2-parametre

— en detaljeret beskrivelse af procedurer anvendt til at standardisere observationer og procedurer samt operationelle definitioner for bedømmelse af observationer

— en liste over alle anvendte testprocedurer og begrundelse for anvendelsen heraf

— oplysninger om de anvendte adfærdsmæssige/funktionelle, neuropatologiske og morfometriske procedurer, herunder oplysninger og detaljer om automatiserede anordninger

— procedurer for kalibrering og sikring af anordningernes ækvivalens og afbalancering af behandlingsgrupper i testprocedurer

— kort begrundelse for evt. beslutninger baseret på faglig vurdering

— detaljeret beskrivelse af alle adfærdsmæssige, funktionelle, neuropatologiske og morfometriske fund efter køn og dosisgruppe, herunder både stigninger og fald i forhold til kontrolgrupper

— hjernevægt

— evt. diagnoser udledt af neurologiske tegn og læsioner, herunder naturligt forekommende sygdomme eller tilstande

— billeder af eksemplariske fund

— »low-power«-billeder til at vurdere homologien af snit anvendt til morfometri

— statistisk behandling af resultater, herunder statistiske modeller anvendt til analyse af data og resultater, uanset om de var signifikante eller ej

— evt. andre toksiske virkningers sammenhæng med en konklusion vedrørende testkemikaliets neurotoksiske potentiale fordelt på køn og dosisgruppe

— evt. toksikokinetiske oplysningers indvirkninger på konklusionerne

— data, der støtter testmetodens pålidelighed og følsomhed (dvs. positive og tidligere kontroldata)

— evt. sammenhæng mellem neuropatologiske og funktionelle virkninger

— NOAEL- eller benchmarkdosis for moderdyr og afkom fordelt på køn og dosisgruppe

— diskussion af den samlede datafortolkning baseret på resultaterne, herunder en konklusion om, hvorvidt kemikaliet forårsagede udviklingsneurotoksicitet og NOAEL.

Kohorte 3-parametre

— serum-IgM-antistoftiter (sensibilisering over for SRBC eller KLH) eller spleniske IgM-PFC-enheder (sensibilisering over for SRBC)

— TDAR-metodens effektivitet bekræftes som led i optimeringsprocessen for laboratorier, der foretager analysen første gang, og periodisk (f.eks. årligt) for alle laboratorier

— diskussion af den samlede datafortolkning baseret på resultaterne, herunder en konklusion om, hvorvidt kemikaliet forårsagede udviklingsimmunotoksicitet og NOAEL.

Diskussion af resultater

Konklusioner, herunder NOAEL-værdier for virkninger på forældre og afkom

Alle oplysninger, som ikke er fremkommet under undersøgelsen, men er nyttige for fortolkningen af resultaterne (f.eks. virkningernes ligheder med kendte neurotoksiske stoffer), anføres også.

Fortolkning af resultater

80. En udvidet reproduktionstoksicitetsundersøgelse i én generation vil om nødvendigt give information om virkningerne af gentagen eksponering for et kemikalie i alle faser af reproduktionscyklussen. Navnlig giver undersøgelsen information om forplantningssystemet og om endepunkter vedrørende afkommets udvikling, vækst, overlevelse og funktioner indtil PND 90.

81. Ved fortolkning af undersøgelsens resultater tages der hensyn til alle tilgængelige oplysninger om kemikaliet, bl.a. fysisk-kemiske, TK- og toksikodynamiske egenskaber, tilgængelige relevante oplysninger om strukturelt beslægtede stoffer og resultater af tidligere gennemførte toksicitetsundersøgelser med testkemikaliet (f.eks. akut toksicitet, toksicitet efter gentagen anvendelse, mekanistiske undersøgelser og undersøgelser til vurdering af, om der er betydelige kvalitative og kvantitative artsforskelle i metaboliske egenskaber in vivo-/in vitro). Resultaterne af den makroskopiske obduktion og organvejningen sammenholdes med observationer fra andre undersøgelser med gentagen dosering, når det er praktisk muligt. Fald i væksten hos afkom kan sammenholdes med testkemikaliets påvirkning af mælkens sammensætning (29).

Kohorte 2 (udviklingsneurotoksicitet)

82. Neuroadfærdsmæssige og neuropatologiske resultater fortolkes i forbindelse med alle fund efter en »weight-of-evidence«-tilgang med ekspertvurdering. Evt. mønstre i adfærdsmæssige eller morfologiske fund samt tegn på dosisrespons diskuteres. Evalueringen af udviklingsneurotoksicitet, bl.a. humanepidemiologiske undersøgelser eller caserapporter og undersøgelser med dyreforsøg (f.eks. toksikokinetiske data, oplysninger om struktur/aktivitet, data fra andre toksicitetsundersøgelser), medtages i denne karakterisering. Evalueringen af data skal indeholde en diskussion af både biologisk og statistisk signifikans. Evalueringen skal indeholde en evt. sammenhæng mellem observerede neuropatologiske og adfærdsmæssige forandringer. Med hensyn til vejledning om fortolkning af udviklingsneurotoksicitetsresultater henvises til testmetode B.53 (35) og Tyl et al., 2008 (31).

Kohorte 3 (udviklingsimmunotoksicitet)

83. Undertrykkelse eller styrkelse af immunfunktionen som vurderet gennem TDAR (T-celleafhængig antistofrespons) vurderes i forbindelse med alle iagttagelser. TDAR-resultatets signifikans kan underbygges af andre virkninger på immunologisk relaterede indikatorer (f.eks. knoglemarvens cellularitet, vægt og histopatologiske undersøgelser af lymfevæv, lymfocyt subset distribution). Virkninger fastslået ved TDAR kan være mindre meningsfulde, i tilfælde af at andre toksiciteter observeres ved lavere eksponeringskoncentrationer.

84. Med hensyn til fortolkningen af reproduktions- og neurotoksicitetsresultater henvises til OECD's vejledning 43 (26).

LITTERATUR

1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006). »A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment«, Critical Reviews in Toxicology, 36, 69-98.

2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999). »Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets«, Lab. Anim. Sci., 49, 530- 536.

3) Zoetis, T. and I. Walls (2003). Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005). »Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group«, International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999). »Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment«, Toxicological Sciences, 49, 1-4.

6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995). »Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey«, Journal of the American College of Toxicologists, 14, 293-327.

7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003). »Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility«, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 37, 356-369.

8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). »Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies«, Journal of Toxicological Sciences, 25, 1-21.

9) Creasy, D.M. (2003). »Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology«, Birth Defects Research, Part B, 68, 408-415.

10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007). »The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies«, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

11) Sadleir, R.M.F.S. (1979). »Cycles and Seasons«, in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999). »Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights«, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977). »Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat«, Biological Reproduction, 17, 298-303.

14) Ladics, G.S. (2007). »Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing«, Methods, 41, 9-19.

15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004). »Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation«, Toxicology, 197, 23-35.

16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989). »A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat«, Fundamental and Applied Toxicology, 12, 92-108.

17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978). »Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats«, Journal of Reproduction and Fertility, 54, 103-107.

18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991). »The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat«. Reproductive Toxicology, 5, 39-44.

19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996). »Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report«, Reproductive Toxicology, 10, 237- 244.

20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992). »Methods for Assessing Rat Sperm Motility«, Reproductive Toxicology, 6, 267-273.

21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992). »Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration«, Journal of Andrology, 13, 409-421.

22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991). »Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations«, Reproductive Toxicology, 5, 449-458.

23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993). »Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer«, Methods in Toxicology, Part A, Academic, Orlando, Florida, s. 319-333.

24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989). »The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations«, Journal of Andrology, 10, 401-415.

25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992). »Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants«, Reproductive Toxicology, 6, 491-505.

26) OECD (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.

27) Working, P.K., M. Hurtt (1987). »Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility«, Journal of Andrology, 8, 330-337.

28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006). »A Best Practices Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today«, Toxicological Pathology, 34, 296-313.

29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006). »Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components«, Food Chemicals Toxicology, 44, 8-16.

30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007). »Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats«, Environmental health perspectives, 115(12), 1717-1726.

31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008). »Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints«, Neurotoxicology and Teratology, 30: 349-381.

32) OECD (1996). Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.

33) Kapitel B.43 i dette bilag, Neurotoksicitetsundersøgelse i gnavere

34) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO (2000)7, OECD, Paris.

35) Kapitel B.53 i dette bilag, Udviklingsneurotoksicitetsundersøgelse

36) Kapitel B.54 i dette bilag, Uterotrofisk bioassay med gnavere: en korttidsscreeningtest for østrogene egenskaber

37) Kapitel B.55 i dette bilag, Hershberger-bioassay med rotter: et korttidsscreeningassay for (anti)androgene egenskaber

38) OECD (2009). Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.

39) OECD (2011). Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.

40) OECD (2013). Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

Tillæg 1

Målinger og observationer medtaget i »functional observational battery« (kohorte 2A)

Eget bur og åbent felt	Ved manipulation	Fysiologi
Kropsholdning	Let at flytte	Temperatur
Ufrivillige kloniske eller toniske bevægelser	Let at håndtere	Kropsvægt
Lukning af øjenlåg	Muskeltonus	Pupilrespons
Piloerektion	Respons på tilnærmelse	Pupilstørrelse
Spytflåd	Berøringsrespons	
Tåreflåd	Auditiv respons	
Vokalisationer	Respons på knibning i halen	
Rejse sig op	Opretningsrespons	
Ganganomalier	Valgusfod ved »landing«	
Vækningstærskel	Gribestyrke i forlemmer	
Stereotypi	Gribestyrke i baglemmer	
Mærkelig adfærd		
Pletter		
Respiratoriske anomalier		

Tillæg 2

DEFINITIONER

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Testkemikalie: et stof eller en blanding, som testes ved hjælp af denne testmetode.

B.57. **H295R STEROIDSYNTESETESTEN**

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (Test Guideline (TG) 456 (2011)). OECD iværksatte i 1998 en højt prioriteret aktivitet om revision af eksisterende og udvikling af nye testretningslinjer til screening og test af potentielle hormonforstyrrende kemikalier. OECD's konceptuelle ramme for test og vurdering af hormonforstyrrende kemikalier fra 2002 (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) består af fem trin, som hvert svarer til et forskelligt niveau af biologisk kompleksitet(1). I det in vitro-H295R-steroidgenese-assayet (H295R), der er beskrevet i denne testmetode, bruges en human adrenocarcinomcellelinje (NCI-H295R-celler). Der er tale om et niveau 2-in vitro-assay, der tilvejebringer mekanistiske data til brug for screening og prioritering. Udvikling og standardisering af assayet som en screening for kemiske virkninger på steroidgenese, specifikt produktionen af 17β-østradiol (E2) og testosteron (T), blev foretaget i en flertrinsproces. H295R-assayet er blevet optimeret og valideret (2) (3) (4) (5).

2. Formålet med H295R-steroidgenese-assayet er at detektere kemikalier, der påvirker produktion af E2 og T. Formålet med H295R-assayet er at identificere xenobiotika, hvis målsted(er) (target site) er de endogene komponenter, der omfatter den intracellulære biokemiske vej, som begynder med kædereaktionen fra cholesterol til produktionen af E2 og/eller T. Formålet med H295R-assayet er ikke at identificere kemikalier, der påvirker steroidgenese på grund af indvirkning på hypothalamus-hypofyse-gonadal-aksen. Målet med assayet er at finde et ja-nej-svar med hensyn til et kemikalies potentiale til at fremkalde eller reducere produktionen af T og E2. Der kan dog opnås kvantitative resultater i visse tilfælde (se pkt. 53-54). Assayets resultater udtrykkes i relative forandringer i hormonproduktionen sammenlignet med opløsningsmiddelkontrollerne (SC'er). Målet med assayet er ikke at tilvejebringe specifikke mekanistiske oplysninger om interaktionen mellem testkemikaliet og det endokrine system. Forskning under anvendelse af cellelinjen har haft som formål at identificere virkninger på specifikke enzymer og intermediære hormoner såsom progesteron (2).

3. Definitioner og forkortelser brugt i denne testmetode er beskrevet i bilaget. En detaljeret protokol med instruktioner om, hvordan man fremstiller opløsninger, dyrker celler og gennemfører forskellige af testens aspekter findes i bilag I-III til OECD's dokument »Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production« (4).

INDLEDENDE OVERVEJELSER OG BEGRÆNSNINGER

4. Fem forskellige enzymer, der katalyserer seks forskellige reaktioner, indgår i biosyntesen af steroide kønshormoner. Enzymatisk omdannelse af cholesterol til pregnenolon ved hjælp af cytochrom-P450 (CYP)-cholesterol-sidekædespaltningsenzymet (CYP11A) udgør det første trin i en række biokemiske reaktioner, der kulminerer i syntesen af steroide slutprodukter. Afhængigt af rækkefølgen af de næste to reaktioner deles den steroidgene vej i to, Δ^5-hydroxysteroid-vejen og Δ^4-ketosteroid-vejen, som samles i produktionen af androstenedion (figur 1).

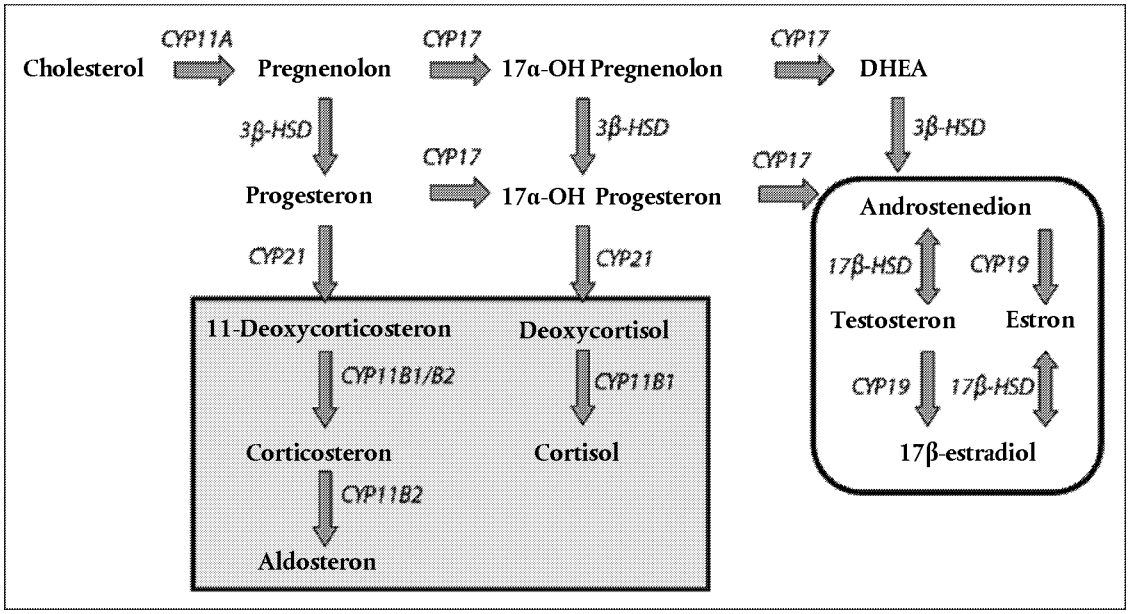
5. Androstenedion omdannes til testosteron (T) af 17β-hydroxysteroid-dehydrogenase (17β-HSD). Testosteron er både et mellem- og et sluthormonprodukt. Hos hannen kan T omdannes til dihydrotestosteron (DHT) af 5α-reduktase, som findes i cellemembraner, kernemembran og endoplasmatisk retikulum af målvæv med androgen effekt såsom prostata og sædblærer. DHT er meget kraftigere som androgen end T og betragtes også som et sluthormonprodukt. H295R-assayet måler ikke DHT (se pkt. 10).

6. Det enzym i den steroidgene veje, der omdanner androgene kemikalier til østrogene kemikalier, er aromatase (CYP19). CYP19 omdanner T til 17β-østradiol (E2) og androstenedion til østron. E2 og T betragtes som slutprodukthormoner i den steroidgene vej.

7. Specificiteten af CYP17'-lyaseaktivitet adskiller sig med hensyn til de intermediære substrater fra art til art. Hos mennesket foretrækker enzymet substrater af Δ^5-hydroxysteroid-vejen (pregnenolon), mens substrater i Δ^4-ketosteroid-vejen (progesteron) foretrækkes hos rotter (19). Sådanne forskelle i CYP17-lyaseaktiviteten kan forklare visse artsafhængige forskelle i reaktionen på kemikalier, der ændrer steroidgenese in vivo (6). Det er påvist, at H295-celler er dem, der kommer tættest på at afspejle ekspressionen af adrenalenzym og steroidproduktionsmønstret hos voksne mennesker (20), men er kendt for at udtrykke enzymer for både Δ^5-hydroxysteroid-vejen og Δ^4-ketosteroid-vejen samt for androgensyntese (7) (11) (13) (15).

Figur 1

Steroidgen vej i H295R-celler



NB
Enzymer er markeret med kursiv, hormoner med fede typer, og pile viser syntesens retning. Grå bagrund viser corticosteroid-veje/-produkter. Kønsteroidveje/-produkter er anført i en cirkel. CYP = cytochrom P450, HSD = hydroxysteroid-dehydrogenase, DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Den humane H295R-adreno-carcinomcellelinje er en brugbar in vitro-model til at undersøge effekten på steroidhormonsyntesen (2) (7) (8) (9) (10). H295R-cellelinjen udtrykker gener, der koder for alle de vigtigste enzymer for ovennævnte steroidgenese (11) (15) (figur 1). Dette er en enestående egenskab, fordi in vivo-ekspressionen af disse gener er specifik for væv og udviklingsstadium, hvor et enkelt væv eller enkelt udviklingsstadium typisk ikke udtrykker alle gener, der er involveret i steroidgenese (2). H295R-celler har fysiologiske karakteristika som zonalt udifferentierede adrenalceller hos menneskefostre (11). Cellerne repræsenterer et unikt in vitro-system, idet de har evnen til at producere alle de steroidhormoner, der findes i binyrebarken og kønskirtlerne hos voksne, hvilket gør det muligt at teste for virkninger på både corticosteroid-syntesen og produktionen af kønssteroidhormoner som androgener og østrogener, selv om assayet kun blev godkendt til påvisning af T og E2. Forandringer registreret af testsystemet i form af ændringer i produktionen af T og E2 kan skyldes en lang række forskellige interaktioner mellem testkemikalier og steroidgenfunktioner, der er udtrykt af H295R-cellerne. Disse omfatter modulering af ekspressionen, syntesen eller funktionen af enzymer, der er involveret i produktionen, transformationen eller fjernelsen af steroidhormoner (12) (13) (14). Inhibering af hormonproduktion kan skyldes direkte kompetitiv binding til et enzym i vejen, indvirkning på medvirkende faktorer såsom NADPH (nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat) og cAMP (cyklisk adenosinmonophosphat), og/eller forøgelse af steroidmetabolisme eller suppression af genekspression af visse enzymer i den steroidgene vej. Mens inhibering kan være en funktion af både direkte og indirekte processer i hormonproduktionen, er induktion typisk indirekte, idet den f.eks. indvirker på medvirkende faktorer såsom NADPH og cAMP (som i forbindelse med forskolin), sænker steroidmetabolisme (13) og/eller opregulerer den steroidgene genekspression.

9. H295R-assayet har flere fordele:

— Det gør det muligt at påvise både stigninger og fald i produktionen af både T og E2.

— Det gør det muligt direkte at vurdere et kemikalies potentielle indvirkning på cellers levedygtighed/cytotoksicitet. Dette er vigtigt, fordi det gør det muligt at sondre mellem virkninger, der skyldes cytotoksicitet, og virkninger, der skyldes den direkte interaktion mellem kemikalier og steroidgene veje, hvilket ikke er muligt i vævseksplantatsystemer, der består af flere celletyper med varierende sensitivitet og funktionaliteter.

— Det kræver ikke brug af dyr.

— H295R-cellelinjen er kommercielt tilgængelig.

10. Assayets største begrænsninger er følgende:

— Dets metaboliske kapacitet er ukendt, men sandsynligvis ret begrænset. Kemikalier, der skal være metabolisk aktiveret, vil derfor sandsynligvis mangle i dette assay.

— H295R, der er afledt af adrenalvæv, indeholder enzymer, som kan fremstille gluco- og mineralcorticoiderne samt kønshormonerne. Indvirkningen på produktionen af gluco- og mineralcorticoider kan derfor påvirke de T- og E2-niveauer, der er observeret i assayet.

— Det måler ikke DHT og forventes derfor ikke at påvise kemikalier, der hæmmer 5α-reduktase. I så fald kan Hershberger-assayet (16) anvendes.

— H295R-assayet påviser ikke kemikalier, der forstyrrer steroidgenesen ved at påvirke hypothalamus-hypofyse-gonadal-aksen (HPG), da dette kun kan undersøges hos intakte dyr.

PRINCIP FOR TESTEN

11. Formålet med assayet er påvisning af kemikalier, der påvirker produktionen af T og E2. T er også et mellemprodukt i vejen til produktion af E2. Assayet kan påvise kemikalier, der typisk inhiberer eller inducerer den steroidgene vejs enzymer.

12. Assayet gennemføres normalt under almindelige celledyrkningsbetingelser i cellekulturplader med 24 brønde. Alternativt kan der bruges andre pladestørrelser i assayet. Podnings- og forsøgsbetingelser skal dog tilpasses tilsvarende for at sikre overholdelse af ydeevnekriterierne.

13. Efter en akklimatiseringsperiode på 24 timer i multibrøndplader udsættes cellerne i 48 timer for syv koncentrationer af testkemikaliet, mindst in triplo. Opløsningsmiddel og en kendt inhibitor og inducer af hormonproduktion anvendes i en fast koncentration som negative og positive kontroller. Efter eksponeringsperioden fjernes mediet fra hver brønd. Cellelevedygtigheden i hver brønd analyseres umiddelbart efter fjernelsen af mediet. Hormonkoncentrationer i mediet kan måles under anvendelse af forskellige metoder, herunder kommercielt tilgængelige hormonmålekit og/eller instrumentelle teknikker såsom væskekromatografi-massespektometri (LC-MS). Data udtrykkes som foldsændring i forhold til opløsningsmiddelkontrollen og laveste koncentration med observeret effekt (Lowest-Observed-Effect-Concentration (LOEC)). Hvis assayet er negativt, angives den højeste testede koncentration som koncentration uden observeret effekt (No-Observed-Effect-Concentration (NOEC)). Konklusioner vedrørende et kemikalies evne til at påvirke steroidgenese baseres på mindst to uafhængige testkørsler. Den første testkørsel fungerer som en range-finding-kørsel med efterfølgende tilpasning af koncentrationer for kørsel 2 og 3, hvis der opstår problemer med opløselighed eller cytotoksicitet, eller kemikaliets aktivitet ser ud til at være i slutningen af de testede koncentrationsinterval.

DYRKNINGSPROCEDURE

Cellelinje

14. NCI-H295R-cellerne er kommercielt tilgængelige fra American Type Culture Collections (ATCC) efter underskrivelse af en materialeoverførselsaftale (MTA) ([1]).

Indledning

15. På grund af forandringer i cellernes kapacitet til at producere E2 i takt med stigende alder/antal generationer (2) dyrkes cellerne efter en specifik protokol, før de bruges, og antal generationer efter optøning af cellerne og antal generationer på tidspunktet for nedfrysningen af cellerne og placering deraf i flydende nitrogen for opbevaring noteres. Det første tal viser det faktiske antal cellegenerationer og det andet beskriver antal generationer på det tidspunkt, hvor cellerne blev nedfrosset og efterfølgende opbevaret. Celler, der f.eks. blev nedfrosset efter femte generation, optøet og derefter spaltet tre gange (fire generationer, hvor frisk optøede celler tæller som generation 1), efter at de blev dyrket igen, betegnes generation 4,5. Et eksempel på en plan for nummerering findes i valideringsrapportens bilag I (4).

16. Der anvendes et stammedium som grundlag for berigede og frosne medier. Beriget medium er en nødvendig komponent i forbindelse med dyrkning af celler. Frysemedium er specifikt udviklet med henblik på langtidsnedfrysning af celler til opbevaring uden indvirkning på dem. Før brug analyseres Nu-serum (eller et tilsvarende

([1]) ATCC CRL-2128, ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

serum med samme egenskaber, der påviseligt producerer data, som opfylder testkravene og kvalitetskontrolkravene), som er en bestanddel af beriget medium, for baggrundskoncentrationer af T og E2. Fremstillingen af disse opløsninger er beskrevet i bilag II til valideringsrapporten (4).

17. Efter igangsættelse af en H295R-cellekultur på baggrund af en oprindelig ATCC-batch skal cellerne dyrkes i fem generationer, dvs. at cellerne deles fire gange). Derefter nedfryses femtegenerationsceller i flydende nitrogen med henblik på opbevaring. Før cellerne nedfryses, foretages der en kørsel af fjerdegenerationscellerne i en kvalitetskontrolplade (se pkt. 36-37) for at efterprøve, om grundproduktionen af hormoner og reaktionen på positive kontrolkemikalier opfylder kvalitetskontrolkriterierne for assayet som fastlagt i tabel 5.

18. H295R-celler skal dyrkes, nedfryses og opbevares i flydende nitrogen for at sikre, at der altid er celler af passende generation/alder til rådighed til dyrkning og anvendelse. Det maksimale antal generationer, efter der er at iværksat dyrkning af en ny ([1]) eller nedfrossen ([2]) batch af celler, der kan accepteres til brug for H295R-assayet, må ikke overstige 10. Der kan f.eks. accepteres 4,5-10,5 generationer for cellekulturer fra en batch, der er nedfrosset i generation 5. For celler, hvor dyrkningen iværksættes fra disse nedfrosne batches, følges proceduren i pkt. 19. Disse celler dyrkes i mindst fire (4) yderligere generationer (generation 4,5), før de anvendes til test.

Stamceller fra nedfrossen beholdning

19. Proceduren for at iværksætte dyrkning eller test af celler fra nedfrossen beholdning bruges, når en ny batch af celler hentes fra opbevaring i flydende nitrogen. Yderligere oplysninger om denne procedure findes i bilag III til valideringsrapporten (4). Celler fjernes fra opbevaring i flydende nitrogen, optøs hurtigt, anbringes i beriget medium i et centrifugeglas, centrifugeres ved stuetemperatur, genopslæmmes i beriget medium og overføres til en dyrkningsflaske. Mediet udskiftes dagen efter. H295R-cellerne dyrkes i en inkubator ved 37 °C med 5 % CO_2 i atmosfærisk luft, og mediet fornyes 2-3 gange ugentligt. Når cellerne er omtrent 85-90 % sammenflydende, skal de spaltes. Cellespaltning er nødvendig for at sikre, at cellerne er sunde, at de vokser celler og for at have celler til rådighed til bioassays. Cellerne skylles tre gange i phosphatbufferet saltopløsning (PBS, uden Ca^{2+} Mg^{2+}) og udskilles fra dyrkningsflasken ved tilsætning af et passende adskillelsesenzym, f.eks. trypsin, i PBS (uden Ca^{2+} Mg^{2+}). Umiddelbart efter at cellerne adskilles fra dyrkningsflasken, indstilles enzymprocessen ved tilsætning af beriget medium i forholdet 3 × den mængde, der er anvendt til enzymbehandlingen. Celler anbringes i et centrifugeglas, centrifugeres ved stuetemperatur, supernatanten fjernes, og cellemassen genopslæmmes i beriget medium. En passende mængde celleopløsning placeres i den nye dyrkningsflaske. Mængden af celleopløsning tilpasses, så cellerne er sammenflydende inden for 5-7 dage. Det anbefalede subdyrkningsforhold er 1:3 til 1:4. Pladen mærkes omhyggeligt. Cellerne er nu klar til brug i assayet, og overskydende celler nedfryses i flydende nitrogen som beskrevet i pkt. 20.

Nedfrysning af H295R-celler (fremstilling af celler til opbevaring i flydende nitrogen)

20. Til fremstilling af H295R-celler til nedfrysning følges den ovenfor beskrevne procedure for spaltning af celler indtil fasen med genopslæmming af cellemassen i bunden af centrifugeglasset. Her genopslæmmes cellemassen i frysemedium. Opløsningen overføres til et kryogent hætteglas, mærkes omhyggeligt og nedfryses ved – 80 °C i 24 timer, hvorefter det kryogene hætteglas overføres til opbevaring i flydende nitrogen. Yderligere oplysninger om denne procedure findes i bilag III til valideringsrapporten (4).

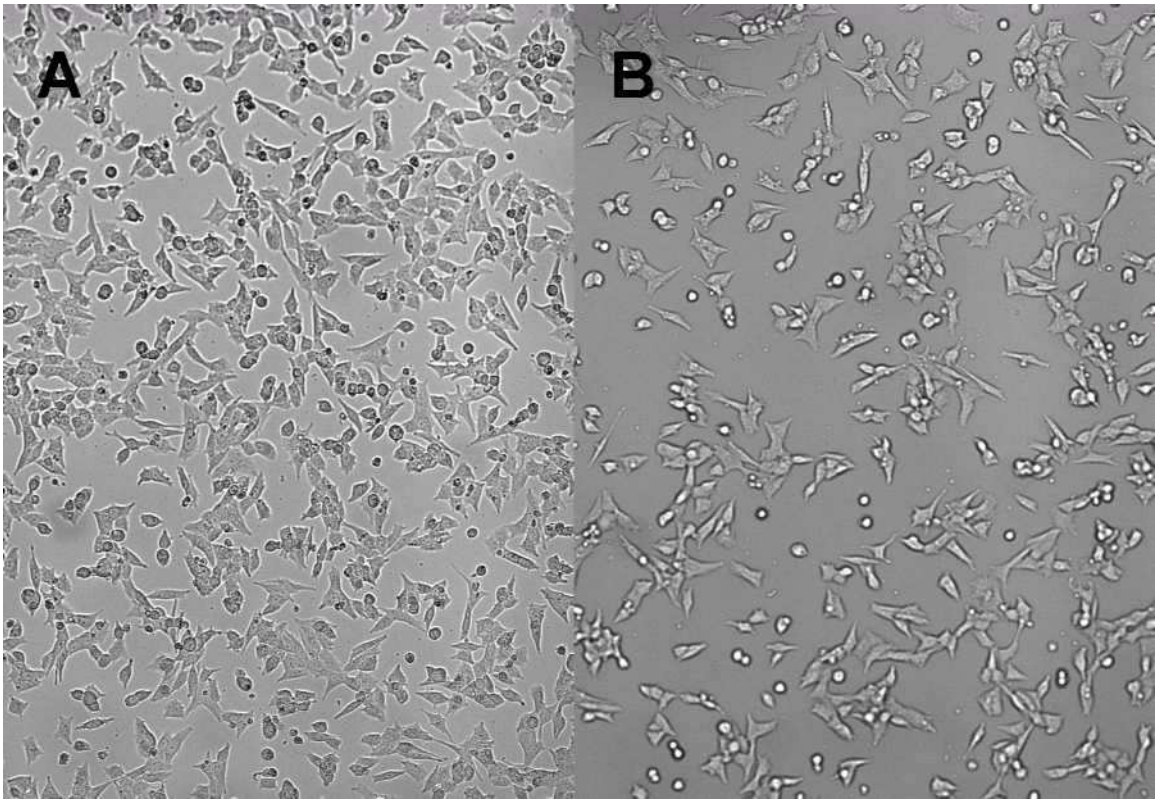
Udpladning og præinkubation af celler til test

21. Det nødvendige antal af 24-brøndsplader, fremstillet som beskrevet i pkt. 19, afhænger af antallet af kemikalier, der skal testes, og cellernes konfluens i dyrkningsskålene. Generelt er der i en dyrkningsflaske (75 cm^2) med 80-90 % sammenflydende celler nok til 1-1 1/2 plader (med 24 brønde) med en måltæthed på 200 000-300 000 celler pr. ml medium, hvilket resulterer i omtrent 50-60 % konfluens i brøndene efter 24 timer (figur 2). Dette er typisk den optimale celletæthed til hormonproduktion i assayet. Ved højere tætheder ændres produktionsmønstrene for både T og E2. Før assayet foretages for første gang, anbefales det at teste forskellige podningstætheder i størrelsesordenen 200 000-300 000 celler pr. ml, og den tæthed, der resulterer i en konfluens på 50-60 % i brønden efter 24 timer, vælges til yderligere eksperimenter.

([1]) »Ny batch« betyder en frisk batch af celler fra ATCC.
([2]) »Nedfrossen batch« betyder celler, der er dyrket tidligere og senere nedfrosset på et andet laboratorium end ATCC.

Figur 2

Fotomikrograf af H295R-celler med en podningstæthed på 50 % i en dyrkningsplade med 24 brønde efter 24 timer taget ved kant (A) og i midten (B) af en brønd.



22. Mediet afpipetteres fra dyrkningsflasken, og cellerne skylles tre gange med sterilt PBS (uden $Ca^{2+}Mg^{2+}$). En enzymopløsning (i PBS) tilsættes for at adskille cellerne fra dyrkningsflasken. Efter at cellerne har haft passende tid til at adskilles, standses enzymprocessen ved tilsætning af beriget medium i forholdet 3 × den mængde, der er anvendt til enzymbehandlingen. Celler anbringes i et centrifugeglas, centrifugeres ved stuetemperatur, supernatanten fjernes, og cellemassen genopslæmmes i beriget medium. Celletætheden beregnes ved hjælp af f.eks. et hæmocytometer eller celletæller. Celleopløsningen fortyndes til den ønskede udpladningstæthed og blandes omhyggeligt for at sikre en homogen celletæthed. Cellerne udplades med 1 ml af celleopløsningen/brønden, og plader og brønde mærkes. De podede plader inkuberes ved 37 °C under 5 % CO_2 i atmosfærisk luft i 24 timer, så cellerne kan binde sig til brøndene.

KVALITETSKONTROLKRAV

23. Det er vigtigt, at der anbringes nøjagtige mængder opløsning og prøver i brøndene under dosering, fordi disse mængder bestemmer de koncentrationer, der bruges i beregningerne af assayets resultater.

24. Før iværksættelse af celledyrkning og efterfølgende test skal hvert laboratorium påvise sit hormonmålesystems følsomhed (punkt 29-31).

25. Hvis der skal anvendes antistofbaserede hormonmålingsassays, analyseres de kemikalier, der skal testes, for deres potentiale til at forstyrre det målesystem, de anvendes til at kvantificere T og E2 som beskrevet i pkt. 32 forud for igangsættelsen af testen.

26. DMSO er det anbefalede opløsningsmiddel til assayet. Hvis der bruges et andet opløsningsmiddel, skal følgende fastslås:

— testkemikaliets, forskolins og procloraz' opløselighed i opløsningsmidlet

— cytotoksiciteten som en funktion af opløsningsmidlets koncentration.

Det anbefales, at den maksimalt tilladelige opløsningsmiddelkoncentration ikke overstiger en 10 × fortynding af den mindst cytotoksiske koncentration af opløsningsmidlet.

27. Før testen gennemføres for første gang, gennemfører laboratoriet et testforsøg for at godtgøre, at det er i stand til at opretholde og fremstille en passende cellekultur, og at de opfylder de forsøgsmæssige betingelser for kemisk test som beskrevet i pkt. 33-35.

28. Når der iværksættes test med en ny batch, køres en kontrolplade før brug af en ny batch af celler for at vurdere cellernes adfærd som beskrevet i pkt. 36-37.

Hormonmålesystemets ydeevne

Metodens sensitivitet, nøjagtighed, præcision og krydsreaktivitet i forhold til prøvematrix

29. Alle laboratorier kan frit vælge deres eget hormonmålesystem til analyse af produktionen af T og E2 med H295R-celler, blot det opfylder ydeevnekriterierne, herunder bestemmelsesgrænsen (LOQ). Nominelt er disse 100 pg/ml for T og 10 pg/ml for E2, baseret på de basalhormonniveauer, der er observeret i valideringsundersøgelserne. Der kan dog anvendes højere eller lavere niveauer afhængigt af basalhormonniveauet, som det laboratorium, der foretager analysen, har opnået. Forud for initiering af kvalitetskontrolpladen og testkørsler påviser laboratoriet, at det hormonassay, der skal anvendes, kan måle hormonkoncentrationer i beriget medium med tilstrækkelig nøjagtighed og præcision til at opfylde kvalitetskontrolkriterierne i tabel 1 og 5, ved at analysere beriget medium spiked med en intern hormonkontrol. Beriget medium spikes med mindst tre koncentrationer af hvert hormon (f.eks. 100, 500 og 2 500 pg/ml T og 10, 50 og 250 pg/ml E2, eller de lavest mulige koncentrationer baseret på påvisningsgrænserne for det valgte hormonmålesystem kan bruges til de laveste spike-koncentrationer for T og E2) og analyseres. Målte hormonkoncentrationer af ikke-ekstraherede prøver skal ligge inden for 30 % af de nominelle koncentrationer, og variationer mellem replikatmålinger af samme prøve må ikke overstige 25 % (se også tabel 8 for yderligere kvalitetskontrolkriterier). Hvis disse kvalitetskontrolkriterier er opfyldt, antages det, at det valgte hormonmåleassay er tilstrækkelig nøjagtigt, præcist og ikke krydsreagerer med komponenter i mediet (prøvematrix), således at der kunne forventes en betydelig indflydelse på assayets resultat. I så fald kræves der ikke ekstraktion af prøver før målingen af hormoner.

30. Er kvalitetskontrolkriterierne i tabel 1 og 8 ikke opfyldt, kan der opstå en signifikant matrixeffekt, og der bør gennemføres et forsøg med ekstraheret spiked medium. Et eksempel på en ekstraktionsprocedure er beskrevet i bilag II til valideringsrapporten (4). Der bør foretages tredobbelte målinger af hormonkoncentrationerne i de ekstraherede prøver. ([1]) Hvis det kan påvises, at mediets komponenter efter ekstraktion ikke forstyrrer hormonpåvisningsmetoden som defineret i kvalitetskontrolkriterierne, bør alle yderligere forsøg foretages med ekstraherede prøver. Hvis kvalitetskontrolkriterierne ikke kan opfyldes efter ekstraktion, er det anvendte hormonmålesystem ikke egnet til anvendelse i H295R-steroidgenese-assayet, og der bør anvendes en anden metode til hormonpåvisning.

Standardkurve

31. Hormonkoncentrationerne i opløsningsmiddelkontrollerne (SC) bør ligge inden for den lineære del af standardkurven. SC-værdierne bør ligge tæt på midten af den lineære del for at sikre, at induktion og inhibering af hormonsyntese kan måles. De fortyndinger af medium (eller ekstrakter), der skal måles, udvælges i overensstemmelse hermed. Det lineære forhold bestemmes under anvendelse af en velegnet statistisk tilgang.

Test for kemisk interferens

32. Hvis der skal anvendes antistofbaserede assays såsom ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) og RIA (Radio-Immuno Assays) til at måle hormoner, testes hvert testkemikalie for potentiel interferens med det hormonmålesystem, der skal bruges, før iværksættelse af den faktiske test af kemikalierne (bilag III til valideringsrapporten (4)), fordi nogle kemikalier kan forstyrre disse test (17). Hvis der optræder en interferens på ≥ 20 % af basalhormonproduktion for T og/eller E2 som fastslået ved hormonanalyse, køres interferenstesten (Chemical Hormone

([1]) *NB:* Hvis ekstraktion er påkrævet, foretages der tre gentagne målinger for hvert ekstrakt. Hver prøve ekstraheres kun én gang.

Assay Interference Test) (som beskrevet i bilag III til valideringsrapporten (4) afsnit 5.0) for alle fortyndinger af testkemikaliets stamopløsning for at identificere den tærskeldosis, hvor der optræder betydelig interferens (≥ 20 %). Hvis interferensen er under 30 %, kan resultaternes korrigeres for denne. Hvis interferensen overstiger 30 %, er dataene ugyldige, og dataene ved disse koncentrationer bør kasseres. Hvis et testkemikalie interfererer med et hormonmålesystem ved mere end en ikkecytotoksisk koncentration, bør der anvendes et andet hormonmålesystem. For at undgå interferens fra kontaminerende kemikalier anbefales det at ekstrahere hormoner fra mediet ved hjælp af et dertil egnet opløsningsmiddel. Mulige metoder kan findes i valideringsrapporten (4).

Tabel 1

Ydeevnekriterier for hormonmålesystemer

Parameter	Kriterium
Målemetodens sensitivitet	Bestemmelsesgrænse (LOQ) T: 100 pg/ml, E2: 10 pg/ml [a]
Effektiviteten af hormonekstraktion (kun når ekstraktion er nødvendig)	De gennemsnitlige genvindingsprocenter (baseret på tredobbelte målinger) for spinkede mængder hormon må ikke afvige mere end 30 % fra den mængde, der blev tilsat.
Kemisk interferens (kun systemer baseret på antistof)	Der bør ikke indtræde nogen væsentlig (≥ 30 % af basalhormonproduktionen af det respektive hormon) krydsreaktivitet med de hormoner, der er fremstillet af cellerne [b], [c]

[a] *NB*: Metodemålegrænser er baseret på værdierne for basalhormonproduktion i tabel 5 og på ydeevne. Hvis der kan sikres en større basalhormonproduktion, kan grænsen være større.

[b] Nogle T- og E2-antistoffer kan krydsreagere med androstendion og østron ved en større procentdel. I disse tilfælde er det ikke muligt at fastslå effekten på 17β-HSD nøjagtigt. Dataene kan dog stadig give nyttige oplysninger om effekten på østrogen- eller androgenproduktionen generelt. I disse tilfælde bør data udtrykkes som androgen-/østrogenreaktioner snarere end E2 og T.

[c] Disse omfatter: cholesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoxycorticosteron, corticosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon, 17α-progesteron, deoxycortisol, cortisol, DHEA, androstenedion og østron.

Godkendelsestest af laboratoriet

33. Før ukendte kemikalier testes, skal et laboratorium påvise, at det er i stand til at fremstille og opretholde en egnet cellekultur, og at det opfylder testbetingelserne for at sikre en vellykket gennemførelse af assayet, ved at gennemføre en godkendelsestest af laboratoriet. Da kvaliteten af et assay hænger direkte sammen med det laboratoriepersonale, der gennemfører dette, bør disse procedurer delvist gentages, hvis der sker ændringer i personalesammensætningen.

34. Denne godkendelsestest gennemføres under de samme betingelser som beskrevet i pkt. 38-40, idet celler udsættes for syv stigende koncentrationer af stærke, moderate og svage inducere og inhibitorer samt et negativt kemikalie (se tabel 2). Specifikt omfatter de kemikalier, der skal testes, den stærke inducer forskolin (CAS-nr. 66575-29-9), den stærke inhibitor prochloraz (CAS-nr. 67747-09-5), den moderate inducer atrazin (CAS-nr. 1912-24-9), den moderate inhibitor aminoglutethimid (CAS-nr. 125-84-8), den svage inducer (E2-produktion) og den svage inhibitor (T-produktion) bisphenol A (CAS-nr. 80-05-7) samt den negative kemiskel humant chorion-gonadotropin (HCG) (CAS-nr. 9002-61-3) som vist i tabel 2. Separate plader køres for alle kemikalier under anvendelse af det format, der er vist i tabel 6. En kvalitetskontrolplade (tabel 4, pkt. 36-37) indgår i hver daglig kørsel for kompetencekemikalierne.

Tabel 2

Kompetencekemikalier og eksponeringskoncentrationer

Kompetencekemikalie	Testkoncentrationer [μM]
Prochloraz	0 [a], 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Forskolin	0 [a], 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Kompetencekemikalie	Testkoncentrationer [µM]
Atrazin	0 [a], 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Aminoglutethimid	0 [a], 0,03, 0,1, 3, 10, 30, 100
Bisphenol A	0 [a], 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 [a], 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

[a] (DMSO) opløsningsmiddelkontrol (0), 1 µl DMSO/brønd

Udsættelse af H295R for kompetencekemikalier bør ske i plader med 24 brønde under laboratoriets godkendelsestest. Dosering er i µM for alle doser af testkemikalier. Doser bør indgives i DMSO ved 0,1 % v/v pr. brønd. Alle testkoncentrationer testes i tredobbelte brønde (tabel 6). Separate plader køres for hvert kemikalie. En kvalitetskontrolplade indgår i hver daglig kørsel.

35. Analyser af cellelevedygtighed og hormoner gennemføres som anført i pkt. 42-46. Tærskelværdien (laveste observerede effektkoncentration, LOEC) og klassificeringsafgørelser rapporteres og sammenlignes med værdierne i tabel 3. Dataene betragtes som acceptable, hvis de opfylder LOEC og klassificeringsafgørelsen i tabel 3.

Tabel 3

Tærskelværdier (LOEC) og klassificeringsafgørelse for kompetencekemikalier

	CAS-nr.	LOEC [µM]		Klassificeringsafgørelse	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ [a] (Inhibering)	+ (Inhibering)
Forskolin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (Induktion)	+ (Induktion)
Atrazin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (Induktion)	+ (Induktion)
Aminoglute-thimid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (Inhibering)	+ (Inhibering)
Bisphenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (Inhibering)	+ (Induktion)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	Negativ	Negativ

[a] +, positiv

n/a: ikke relevant, da der ikke bør indtræde ændringer efter udsættelse for ikkecytotoksiske koncentrationer ved negativ kontrol.

Kvalitetskontrolplade

36. Kvalitetskontrolpladen (QC-plade) bruges til at kontrollere H295R-cellernes ydeevne under standarddyrkningsforhold og til at oprette en historisk database for hormonkoncentrationer i opløsningsmiddelkontroller og negative kontroller samt andre kvalitetskontrolmålinger over tid.

— H295R-cellers ydeevne bør vurderes ved hjælp af en QC-plade for hver ny ATCC-batch eller efter anvendelse af nedfrosne celler for første gang, medmindre laboratoriets godkendelsestest (punkt 32-34) er kørt med samme cellebatch.

— En QC-plade giver en fuldstændig vurdering af assaybetingelserne (f.eks. cellernes levedygtighed, opløsningsmiddelkontroller, negative og positive kontroller samt levedygtighed intra- og inter-assay) ved test af kemikalier og bør indgå i hver testkørsel.

37. QC-testen foretages i en plade med 24 brønde og følger samme procedurer for inkubation, dosering, cellelevedygtighed/-cytotoksicitet, hormonekstraktion og hormonanalyse som beskrevet i pkt. 38-46 for test af kemikalier. QC-pladen indeholder tomme brønde, opløsningsmiddelkontroller og to koncentrationer af en kendt inducer

(forskolin, 1, 10 μM) og inhibitor (prochloraz, 0,1, 1 μM) fra E2- og T-syntese. Desuden bruges MeOH i udvalgte brønde som en positiv kontrol til levedygtigheds-/cytotoksicitetsassayet. Der findes en detaljeret beskrivelse af pladen i tabel 4. De kriterier, der skal opfyldes på QC-pladen, findes i tabel 5. Den minimale basalhormonproduktion for T og E2 skal opnås i både opløsningsmiddelkontrol og tomme brønde.

Tabel 4

Kvalitetskontrolpladelayout for test af ydeevne for ikkeudsatte H295R-celler og celler, der udsættes for kendte inhibitorer (PRO = prochloraz) og stimulatorer (FOR = forskolin) ved produktion af E2 og T. Efter afslutningen af eksponeringsforsøget og fjernelse af mediet tilsættes en 70 % methanolopløsning til alle MeOH-brønde med henblik på en positiv kontrol for cytotoksicitet (se cytotoksicitetassay i bilag III til valideringsrapporten (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Tom [a]	Tom [a]	Tom [a]	Tom [a] (+ MeOH) [b]	Tom [a] (+ MeOH) [b]	Tom [a] (+ MeOH) [b]
B	DMSO [c] 1 μl	DMSO [c] 1 μl	DMSO [c] 1 μl	DMSO [c] 1 μl (+ MeOH) [b]	DMSO [c] 1 μl (+ MeOH) [b]	DMSO [c] 1 μl (+ MeOH) [b]
C	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
D	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

[a] Celler i tomme brønde tilsættes kun medium (f.eks. ikke opløsningsmiddel).
[b] Methanol (MeOH) tilsættes **efter** afslutningen af udsættelsen, og efter at mediet er fjernet fra disse brønde.
[c] DMSO-opløsningsmiddelkontrol (1 μl/well).

Tabel 5

Ydeevnekriterier for kvalitetskontrolplade

	T	E2
Basalhormonproduktion i opløsningsmiddelsmiddelkontrollen (SC)	≥ 5 gange LOQ	≥ 2,5 gange LOQ
Induktion (10 μM forskolin)	≥ 1,5 gange SC	≥ 7,5 gange SC
Inhibition (1μM prochloraz)	≤ 0,5 gange SC	≤ 0,5 gange SC

PROCEDURE FOR EKSPONERING FOR TESTKEMIKALIE

38. De præinkuberede celler fjernes fra inkubatoren (punkt 21) og kontrolleres under et mikroskop for at sikre, at de er i god stand (binding og morfologi) før dosering.

39. Cellerne anbringes i et biosikkerhedskabinet, og det berigede medium fjernes og erstattes med nyt beriget medium (1 ml/brønd). DMSO er det foretrukne opløsningsmiddel til denne testmetode. Hvis der imidlertid er grund til at bruge andre opløsningsmidler, beskrives rationalet. Cellerne udsættes for testkemikaliet ved tilsætning af 1 μl af den passende stamopløsning i DMSO (se bilag II til valideringsrapporten (4)) pr. 1 ml beriget medium (brøndvolumen). Dette resulterer i en endelig koncentration på 0,1 % DMSO i brøndene. For at sikre tilstrækkelig blanding

foretrækkes det generelt, at den passende stamopløsning af testkemikaliet i DMSO blandes med beriget medium for at sikre den ønskede endelige koncentration for hver dosis, og at blandingen tilsættes hver brønd umiddelbart efter fjernelse af det gamle medium. Hvis denne mulighed vælges, skal koncentrationen af DMSO (0,1 %) være den samme i alle brønde. Brønde med de to største koncentrationer bedømmes visuelt ved hjælp af et stereomikroskop med henblik på påvisning af evt. dannelse af bundfald eller uklarheder som en indikation for ufuldstændig opløselighed i testkemikaliet. Hvis noget sådant (uklarheder eller dannelse af bundfald) konstateres, undersøges brønde med lavere koncentrationer også (osv.), og koncentrationer, der ikke gik fuldstændigt i opløsning, udelukkes fra yderligere evaluering og analyse. Pladen anbringes igen i inkubatoren ved 37 °C under en 5 % CO_2 i atmosfærisk luft i 48 timer. Layoutet for testkemikaliepladen er vist i tabel 6. Stamopløsning 1-7 viser placering af stigende doser af testkemikaliet.

Tabel 6

Doseringsprincip for udsættelse af H295R-celler for testkemikalier i en plade med 24 brønde.

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Stamopløsning 4	Stamopløsning 4	Stamopløsning 4
B	Stamopløsning 1	Stamopløsning 1	Stamopløsning 1	Stamopløsning 5	Stamopløsning 5	Stamopløsning 5
C	Stamopløsning 2	Stamopløsning 2	Stamopløsning 2	Stamopløsning 6	Stamopløsning 6	Stamopløsning 6
D	Stamopløsning 3	Stamopløsning 3	Stamopløsning 3	Stamopløsning 7	Stamopløsning 7	Stamopløsning 7

40. Efter 48 timer fjernes eksponeringspladerne fra inkubatoren, og hver brønd kontrolleres under mikroskop for cellernes tilstand (binding, morfologi, grad af konfluens) og tegn på cytotoksicitet. Mediet fra hver brønd deles i to lige store mængder (ca. 490 µl hver) og overføres til to særskilte hætteglas, som mærkes korrekt (dvs. en aliquot med henblik på at sikre en ekstra prøve for hver brønd). For at forhindre udtørring af cellerne fjernes mediet en række eller kolonne ad gangen og erstattes med mediet med henblik på levedygtigheds-/cytotoksicitetassayet af cellen. Hvis cellers levedygtighed/cytotoksicitet ikke måles med det samme, tilsættes 200 µl PBS med Ca^{2+} og Mg^{2+} til hver brønd. Medierne nedfryses til – 80 °C indtil videre behandling for at analysere hormonkoncentrationer (se pkt. 44-46). Mens T og E2 i medium opbevaret ved – 80 °C generelt er stabile i mindst tre måneder, skal hormonstabiliteten under opbevaring dokumenteres i hvert laboratorium.

41. Umiddelbart efter at have fjernet mediet bestemmes cellens levedygtighed/cytotoksicitet for hver eksponeringsplade.

Bestemmelse af cellelevedygtighed

42. Et assay vedrørende cellers levedygtighed/cytotoksicitet kan bruges til at bestemme testkemikaliets potentielle effekt på cellers levedygtighed. Assayet skal tilvejebringe en korrekt måling af procentdelen af levedygtige celler i en brønd, eller det skal påvise, at det er direkte sammenligneligt med (en lineær funktion af) Live/Dead® Assay (se bilag III i valideringsrapporten (4)). Et alternativt assay, der har vist sig at fungere lige så godt, er testen MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid](18). Bedømmelsen af cellelevedygtigheden under anvendelse af ovenstående metoder er en relativ måling, der ikke nødvendigvis står i et lineært forhold til det absolutte antal celler i en brønd. En analytiker bør derfor parallelt foretage en subjektiv visuel bedømmelse af hver brønd, og der bør tages digitale billeder af SC'er og de to største ikkecytotoksiske koncentrationer, som arkiveres med henblik på senere vurdering af reel celletæthed, hvis dette skulle blive nødvendigt. Hvis en visuel inspektion eller levedygtigheds-/cytotoksicitetsassayet viser, at der har været en stigning i antal celler, skal denne tilsyneladende stigning kontrolleres. Hvis der konstateres en stigning i celletallet ved kontrol, anføres dette i testrapporten. Cellelevedygtigheden udtrykkes i forhold til middelreaktionen i SC'erne, der betragtes som 100 % levedygtige celler, og beregnes for det anvendte cellelevedygtigheds-/cytotoksicitetsassay. For MTT-assayet kan følgende formel bruges:

% levedygtige celler = (reaktion i brønd – middelreaktion i MeOH-behandlede [= 100 % døde] brønde) ÷ (middelreaktion i SC-brønde – middelreaktion i MeOH-behandlede [= 100 % døde] brønde)

43. Brønde med en levedygtighed på under 80 % i forhold til den gennemsnitlige levedygtighed i SC'erne (= 100 % levedygtighed) bør ikke indgå i den endelige dataanalyse. Inhibering af steroidgenese ved næsten 20 % cytotoksicitet bør evalueres omhyggeligt for at sikre, at cytotoksicitet ikke er årsagen til inhiberingen.

Hormonanalyse

44. Hvert laboratorium kan bruge et hormonmålesystem efter eget valg til analysen af T og E2. Overskydende aliquoter af medium fra hver behandlingsgruppe kan anvendes til fremstilling af fortyndinger med henblik på at sikre, at koncentrationen ligger inden for den lineære del af standardkurven. Som anført i pkt. 29 skal hvert laboratorium påvise, at deres hormonmålesystem (f.eks. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) overholder kvalitetskontrolkriterierne, ved at analysere beriget medium spiked med en intern hormonkontrol forud for gennemførelsen af kvalitetskontrolkørsler eller test af kemikalier. For at sikre, at testsystemets komponenter ikke forstyrrer målingen af hormoner, kan det være nødvendigt at ekstrahere disse fra mediet før måling (se pkt. 30 for betingelserne for, hvornår ekstraktion er nødvendig eller ikke). Det anbefales at foretage ekstraktion efter procedurerne i bilag III til valideringsrapporten (4).

45. Hvis der anvendes kommercielt testkit til måling af hormonproduktionen, bør hormonanalysen foretages som beskrevet i testkitproducentens manualer. De fleste producenter har en unik procedure for gennemførelse af hormonanalyser. Prøvefortyndinger skal tilpasses, således at de forventede hormonkoncentrationer for opløsningsmiddelkontrollerne kommer til at ligge i midten af den lineære del af standardkurven for det enkelte assay (bilag III i valideringsrapporten (4)). Værdier uden for den lineære del af standardkurven kasseres.

46. Endelige hormonkoncentrationer beregnes som følger:

Eksempel:

Ekstraheret:	450 µl medium
Rekonstitueret i:	250 µl assaybuffer
Fortynding i assay:	1:10 (så prøven kommer til at ligge inden for standardkurvens lineære del)
Hormonkoncentration i assay:	150 pg/ml (allerede tilpasset koncentration pr. ml analyseret prøve)
Genvinding:	89 %
Endelig hormonkoncentration =	(Hormonkoncentration (pr. ml) ÷ genvinding) (fortyndingsfaktor)
Endelig hormonkoncentration =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

Udvælgelse af testkoncentration

47. Der bør gennemføres mindst to uafhængige kørsler af assayet. Medmindre forudgående information om f.eks. opløselighedsgrænser eller cytotoksicitet giver et grundlag for udvælgelse af testkoncentrationer, anbefales det at sprede testkoncentrationerne i den først kørsel efter $\log_{10}$-intervaller, hvor 10^{-3} M er den maksimale koncentration.

Hvis kemikaliet er opløseligt og ikkecytotoksisk ved de testede koncentrationer, og hvis den første kørsel var negativ for alle koncentrationer, skal det bekræftes i endnu en kørsel under samme betingelser som for den først kørsel (tabel 7). Hvis resultaterne af den første kørsel er tvetydige (dvs. at foldsændringen adskiller sig statistisk signifikant fra SC'en ved kun en koncentration) eller positive (dvs. at foldsændringen ved to eller flere koncentrationer er statistisk signifikant) bør testen gentages som angivet i tabel 7 ved at forfine de valgte testkoncentrationer. Testkoncentrationer ved kørsel to og tre (hvis relevant) tilpasses på basis af resultaterne af den første kørsel ved at isolere koncentrationer, der fremkalder en effekt, under anvendelse af et koncentrationsinterval på 1/2-log (hvis den oprindelige kørsel på 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 µM f.eks. resulterede i induktioner ved 1 og 10 µM, bør de koncentrationer, der testes i den anden kørsel, være 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 µM), medmindre der skal anvendes lavere koncentrationer for at sikre en LOEC. I sidstnævnte tilfælde bør der i den anden kørsel anvendes mindst fem koncentrationer under den laveste koncentration, der blev testet i den første kørsel under anvendelse af en 1/2-logaritmisk skala. Hvis den anden kørsel ikke bekræfter den første (dvs. at den statistiske signifikans ikke optræder ved den tidligere positivt testede koncentration ± 1 koncentrationsforøgelse), skal der foretages et tredje forsøg under anvendelse af de oprindelige testbetingelser. Tvetydige resultater i første kørsel betragtes som negative, hvis den observerede effekt ikke kunne bekræftes i de to efterfølgende kørsler. Tvetydige resultater betragtes som positive reaktioner (virkning), når reaktionen kan bekræftes i mindst endnu en kørsel inden for en koncentrationsforhøjelse på a ± 1 (se afsnit 55 med hensyn til datafortolkningsproceduren).

Tabel 7

Afgørelsesmatrix for mulige resultatscenarier

Kørsel 1	Kørsel 2		Kørsel 3		Afgørelse	
Scenario	Afgørelse	Scenario	Afgørelse	Scenario	Positiv	Negativ
Negativ	Bekræft [a]	Negativ	Stop			X
Negativ	Bekræft [a]	Positiv	Forfin [b]	Negativ		X
Tvetydig [c]	Forfin [b]	Negativ	Bekræft [a]	Negativ		X
Tvetydig [c]	Forfin [b]	Negativ	Bekræft [a]	Positiv	X	
Tvetydig [c]	Forfin [b]	Positiv			X	
Positiv	Forfin [b]	Negativ	Bekræft [a]	Positiv	X	
Negativ	Bekræft [a]	Positiv	Forfin [b]	Positiv	X	
Positiv	Forfin [b]	Positiv	Stop		X	

[a] Bekræft foregående kørsel under anvendelse af samme forsøgsdesign.
[b] Gennemfør assayet igen med et koncentrationsinterval på 1/2-log (isolering af den koncentration, der var signifikant forskellig i det foregående forsøg).
[c] Foldsændring ved én koncentration er statistisk signifikant forskellig fra SC'en

Kvalitetskontrol af testpladen

48. Ud over at opfylde kriterierne for kvalitetskontrolpladen skal andre kvalitetskriterier vedrørende acceptabel variation mellem hormonmålesystemers replikatbrønde, kontraforsøg, linearitet og sensitivitet, variabilitet mellem kontrahormonmålinger af samme prøve samt genvindingsprocent af hormon-spikes efter ekstraktion af medium (hvis relevant: se pkt. 30 vedrørende krav til ekstraktion) opfyldes. Disse kvalitetskriterier findes i tabel 8. Data skal ligge inden for de acceptable intervaller som fastlagt for hver parameter, der skal tages i betragtning til yderligere evaluering. Hvis disse kriterier ikke opfyldes, anføres det i regnearket, at kvalitetskontrolkriterierne ikke blev opfyldt for den pågældende prøve, og prøven analyseres igen eller fjernes fra datasættet.

Tabel 8

Acceptable intervaller og/eller variation (%) for parametre for H295R-assayets testplade

(LOQ: Bestemmelsesgrænse for hormonmålesystemet. CV: Variationskoefficient. SC: Opløsningsmiddelkontrol. DPM: Disintegrationer pr. minut)

	Sammenligning mellem	T	E2
Basalhormonproduktion i SC'er	Fold større end LOQ	≥ 5-fold	≥ 2,5-fold
Eksponeringsforsøg — inden for CV for SC'er (replikatbrønde)	Absolutte koncentrationer	≤ 30 %	≤ 30 %
Eksponeringsforsøg — mellem plade-CV for SC'er (replikatforsøg)	Foldsændring	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonmålesystem — sensitivitet	Påviselig fold-reduktion i forhold til SC	≥ 5-fold	≥ 2,5-fold
Hormonmålesystem — replikatmåling af CV for SC'er [a]	Absolutte koncentrationer	≤ 25 %	≤ 25 %
Ekstraktion af medium — genvinding af intern 3H-standard (hvis relevant)	DPM	≥ 65 % nominelt	

[a] Henviser til replikatmålinger af samme prøve.

DATAANALYSE OG RAPPORTERING

Dataanalyse

49. For at evaluere den relative stigning/nedgang i kemisk ændret hormonproduktion normaliseres resultaterne til den gennemsnitlige SC-værdi for hver testplade, og resultaterne udtrykkes som ændringer i forhold til SC'en i hver testplade. Alle data udtrykkes som gennemsnitlig ± 1 standardafvigelse (SD).

50. Kun hormondata fra brønde med en cytotoksicitet på under 20 % medtages i dataanalysen. Relative ændringer beregnes som følger:

Relativ ændring = (hormonkoncentration i hver brønd) ÷ (middel-hormonkoncentration i alle opløsningsmiddel-kontrolbrønde).

51. Hvis der ved visuel inspektion af brønden eller som påvist i levedygtigheds-/cytotoksicitetsassayet, jf. beskrivelse i pkt. 42, viser sig at være en stigning i celletal, kontrolleres denne tilsyneladende stigning. Hvis en stigning i celletal kontrolleres, anføres dette i testrapporten.

52. Før de statistiske analyser vurderes antagelserne vedrørende normalitet og varianshomogenitet. Normalitet bør evalueres under anvendelse af standardsandsynlighedsplots eller en anden hensigtsmæssig statistisk metode (f.eks. Shapiro-Wilk-test). Hvis dataene (foldsændringer) ikke er normalt fordelt, forsøges der foretaget en transformation af dataene for at tilnærme dem en normal fordeling. Hvis dataene er normalt fordelt eller nærmer sig en normal fordeling, analyseres forskellene mellem kemiske koncentrationsgrupper og SC'er ved hjælp af en parametertest (f.eks. Dunnetts test), hvor koncentration er den uafhængige og reaktion (foldsændring) den afhængige variabel. Hvis data ikke er normalt fordelt, bruges en hensigtsmæssig ikkeparametertest (f.eks. Kruskal Wallis eller Steels many-one rank test). Forskelle anses som signifikante ved $p \leq 0{,}05$. Statistiske evalueringer baseres på middelværdier for hver brønd, der repræsenterer uafhængige replikatdatapunkter. Det forventes, at det på grund af det store interval mellem doser i den første kørsel (log_{10}-skala) i mange tilfælde ikke vil være muligt at beskrive klare koncentration-reaktion-forhold, hvor de to største doser vil ligge i den lineære del af sigmoidkurven. I den første kørsel eller ethvert andet datasæt, hvor dette forhold opstår (f.eks. hvor det ikke er muligt at anslå en maksimal virkning), anvendes statistik med fast variabel, type I, som beskrevet ovenfor.

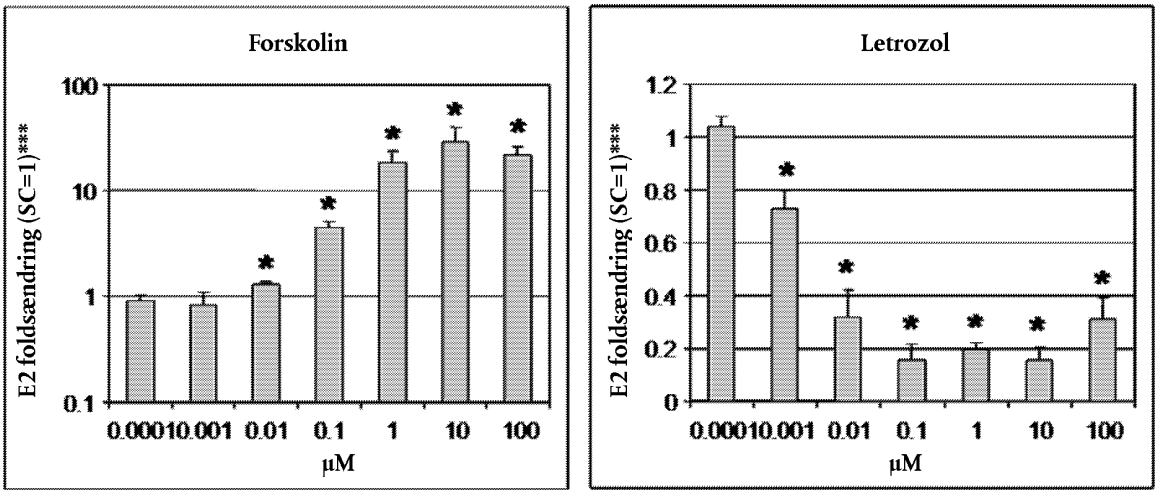
53. Hvis flere end to datapunkter ligger i den lineære del af kurven, og hvor det er muligt at beregne maksimal virkning — som forventet for nogle af andenkørslerne, der foretages ved hjælp af et semi-log-interval for eksponeringskoncentrationer — følges en probit-, logit- eller anden hensigtsmæssig regressionsmodel til at beregne virkningsfulde koncentrationer (f.eks. EC50 og EC20).

54. Resultater anføres både grafisk (blokdiagram, der repræsenterer gennemsnitlig ± 1 SD) og i tabelform (LOEC/NOEC, virkningsretning og styrke af maksimal reaktion, der indgår i dataenes del om dosisrespons) (se f.eks. figur 3). Vurdering af data anses kun for at være gyldig, hvis den er baseret på mindst to uafhængigt af hinanden gennemførte kørsler. Et forsøg eller en kørsel anses for at være uafhængig, hvis den er foretaget på en anden dato under anvendelse af et nyt sæt opløsninger og kontroller. Koncentrationsionsintervallet i kørsel 2 og 3 (hvis nødvendig) kan skræddersyes på grundlag af resultaterne af kørsel 1 for at sikre en bedre definition af det dosisresponsinterval, der indeholder LOEC (se pkt. 47).

Figur 3

Eksempel på præsentation og evaluering af data fra H295R-assayet i grafisk form og tabelform.

Asterisker indikerer statistisk signifikante forskelle i forhold til opløsningsmiddelkontrollen (p< 0,05). LOEC: Lavest observerede effektive koncentration. maks. ændring: Maksimal styrke af den observerede reaktion ved enhver koncentration i forhold til SC-middel-reaktion (= 1)



Kemikalie	LOEC	Maks. ændring
Forskolin	0,01	0,15 fold
Letrozol	0,001	29 fold

Procedure for datafortolkning

55. Et testkemikalie anses for at være positivt, hvis fold-induktionen er statistisk forskellig ($p \leq 0,05$) fra opløsningsmiddelkontrollen ved to nærtliggende koncentrationer i mindst to uafhængige kørsler (tabel 7). Et testkemikalie anses for at være negativt efter to uafhængige negative kørsler eller tre kørsler omfattende to negative og en tvetydig eller positiv kørsel. Hvis data fra tre uafhængige forsøg ikke opfylder afgørelseskriterierne i tabel 7, kan forsøgsresultaterne ikke fortolkes. Resultater ved koncentrationer, der overstiger opløselighedgrænserne eller ved cytotoksiske koncentrationer bør ikke medtages i fortolkningen af resultater.

Testrapport

56. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testlaboratorium

— laboratoriets navn, placering

— forsøgsleder og andre medarbejdere og deres undersøgelsesansvar

— datoer for undersøgelsens begyndelse og afslutning.

Testkemikalie, reagens og kontroller

— betegnelse (navn eller CAS-nr.), oprindelse, parti-/batchnummer, renhed, leverandør og beskrivelse af testkemikaliet, reagenser og kontroller

— testkemikaliets fysiske form og relevante fysisk-kemiske egenskaber

— opbevaringsforhold samt metode og frekvens for tilberedning af testkemikalier, reagenser og kontroller

— testkemikaliets stabilitet.

Celler

— kilde til og type celler

— antal cellegenerationer (identifikation af cellegeneration) for celler anvendt i testen

— beskrivelse af procedurer for opretholdelse af cellekulturer.

Prætestkrav (hvis relevant)

— beskrivelse af resultater af test af kemisk interferens i hormonassay

— beskrivelse og resultater af målinger af effektivitet af hormonekstraktion

— standard- og kalibreringskurver for alle analytiske assays

— detektionsgrænser for udvalgte analytiske assays.

Testbetingelser

— mediers sammensætning

— testkemikaliets koncentration

— celletæthed (anslået eller målt cellekoncentration efter 24 og 48 timer)

— testkemikaliets opløselighed (grænse for opløselighed, hvis denne er fastlagt)

— inkubationtid og -betingelser.

Testresultater

— rådata for hver brønd for kontroller og testkemikalier — hver replikatmåling i form af de oprindelige data tilvejebragt af det instrument, der er brugt til at måle hormonproduktion (f.eks. OD, fluorescensenheder, DPM osv.)

— validering af normalitet eller forklaring på datatransformation

— middelreaktioner ± 1 SD for hver målt brønd

— data for cytotoksicitet (testkoncentrationer, der har forårsaget cytotoksicitet)

— bekræftelse på opfyldelse af kvalitetskontrolkriterier

— relativ forandring sammenlignet med opløsningsmiddelkontrol korrigeret for cytotoksicitet

— et blokdiagram, der viser relativ (foldsændring) ved hver koncentration, SD og statistisk signifikans som anført i pkt. 49-54.

Fortolkning af data

— Anvend datafortolkningsproceduren på resultaterne, og drøft fund.

Diskussion

— Er der indikationer fra undersøgelsen vedrørende muligheden af, at T/E2-dataene kan være påvirket af indirekte indvirkning på gluco- og mineral-corticoid-veje?

Konklusioner

LITTERATUR

1) OECD (2002). OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, i bilag 2 til kapitel B.54 i dette bilag.

2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006). Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, Toxicol. Appl. Pharmacol., 217, 114-124.

3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007). The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. Env. Sci. Pollut. Res., 14, 23 — 30.

4) OECD (2010), Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Tilgængelig på [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

5) OECD (2010). Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Tilgængelig på: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

6) Battelle (2005). Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Tilgængelig på: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004). Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, Toxicol. Sci., 81, 78-89.

8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, Toxicol. Appl. Pharmacol., 182, 44-54.

9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010). Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, Environ. Health Perspect., 118: 265-272.

(0) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010). Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, Environ. Sci. Poll. Res., 17:1137-1148.

11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990). Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, Cancer Res., 50, 5488-5496.

12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010). Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, Chemosphere, 80:578-584.

13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005). Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, Environ. Sci. Technol., 39:2777-2785.

14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010). Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, Environ. Sci. Pol. Res., 17:1137-1148.

15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993). Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, J. Clin. Endocrinol. Metab., 77, 731-737.

16) Kapitel B.55 i dette bilag: Hershberger-bioassay med rotter: et korttidsscreeningassay for (anti)androgene egenskaber.

17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976). Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, J. Lab. Clin. Med., 2, 222-231.

18) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods., 65, 55-63.

19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006). Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

Tillæg

DEFINITIONER

Konfluens betyder den tilladte celledækning af eller -spredning over kulturmediet.

Kemikalie betyder et stof eller en blanding.

CV betegner variationskoefficienten som defineret som forholdet mellem en fordelings standardafvigelse og dens aritmetiske gennemsnit.

CYP står for cytochrom-P450-mono-oxygenaser, en familie af gener og enzymer produceret heraf, der indgår i katalysering af en lang række biokemiske reaktioner, herunder syntese og metabolisme af steroidhormoner.

DPM er disintegration pr. minut. Det er antal atomer i en bestemt mængde radioaktivt materiale, der påviseligt er henfaldet på ét minut.

E2 er 17β-østradiol, det vigtigste østrogen i pattedyrssystemer.

H295R-celler er humane adreno-carcinomceller, der har de fysiologiske karakteristika som zonalt udifferentierede adrenalceller hos menneskefostre, og som udtrykker alle enzymerne i den steroidgene vej. De kan erhverves fra ATCC.

Frysemedium bruges til at nedfryse og opbevare frosne celler. Det består af stammedium BD NuSerum og dimethylsulfoxid.

Lineært interval er det interval i standardkurven for et hormonmålesystem, hvor resultaterne er proportionale med koncentrationen i den analyt, der findes i prøven.

LOQ står for Limit of Quantification og er den mindste mængde af et kemikalie, der kan skelnes fra fraværet af samme kemikalie (en tom værdi) inden for et fastsat konfidensinterval. For denne metode defineres LOQ typisk af producenten af testsystemerne, medmindre andet er angivet.

LOEC står for »Lowest Observed Effect Concentration«, dvs. det laveste koncentrationsniveau, ved hvilket assayresponsen er statistisk forskellig fra opløsningsmiddelkontrollens.

NOEC står for »No Observed Effect Concentration«, hvilket er den højeste testede koncentration, hvis assayet ikke tilvejebringer en positiv respons.

Generation er det antal gange, celler deles efter initiering af en dyrkning fra nedfrosne celler. Den første generation, der blev iværksat fra den nedfrosne beholdning, betegnes som nr. et (1). Celler, der har delt sig én gang, betegnes generation 2 osv.

PBS er Dulbeccos phosphatbufferede saltopløsning.

Kvalitetskontrol, forkortelse QC, henviser til de målinger, der skal sikre gyldige data.

Kvalitetskontrolplade er en 24-brøndsplade indeholdende to koncentrationer af de positive og negative kontroller og anvendes til overvågning af resultaterne af en ny batch celler eller tilvejebringelse af positive kontroller til assayet i forbindelse med test af kemikalier.

Kørsel er et uafhængigt forsøg karakteriseret ved et nyt sæt opløsninger og kontroller.

Stammedium er grundlaget for fremstillingen af andre reagenser. Det består af en 1:1-blanding af Dulbeccos Modified Eagle's Medium og Ham's F-12 Nutrient mixture (DMEM/F12) i 15 mM HEPES-buffer uden phenolrød eller natriumbicarbonat. Natriumbicarbonat tilsættes som buffer, se bilag II til valideringsrapporten (4).

Beriget medium består af stammedium plus BD Nu-Serum og ITS+ premium mix, se bilag II til valideringsrapport (4).

Steroidgenese er den syntesevej, der fører fra cholesterol til forskellige steroidhormoner. Flere mellemprodukter i steroidsyntesevejen såsom progesteron og testosteron er vigtige hormoner selv, men fungerer også som precursorer for hormoner længere ned ad syntesevejen.

T står for testosteron, en af de to vigtigste androgener i pattedyrssystemer.

Testkemikalie er stoffer eller blandinger, der testes med denne testmetode.

Testplade er den plade, hvor H295R-celler eksponeres for testkemikalier. Testplader indeholder opløsningsmiddelkontrollen og testkemikalierne i syv koncentrationsniveauer in triplo.

Trypsin 1X er en fortyndet opløsning af enzymet trypsin, en bygspytkirtel-serinprotease, der anvendes til at løsne celler fra en celledyrkningsplade, se bilag III til valideringsrapporten (4).

B.58. GENMUTATIONSTEST I SOMATISKE CELLER OG KØNSCELLER FRA TRANSGENE GNAVERE

INDLEDNING

1. Denne testmetode svarer til OECD-testvejledningen (TG) 488 (2013). EU's testmetoder er tilgængelige for en lang række in vitro-mutationsassays, der kan påvise kromosomale mutationer og/eller genmutationer. Der findes testmetoder for in vivo-slutpunkter (dvs. kromosomale afvigelser og ikkeplanlagt DNA-syntese). Disse måler dog ikke genmutationer. Assays af mutationer hos transgene gnavere (transgenic rodent, TGR) opfylder behovet for praktiske og lettilgængelige in vivo-test for genmutationer.

2. TGR-mutationsassays er beskrevet indgående (24) (33). Hertil anvendes transgene rotter og mus, der indeholder flere kopier af kromosomt integrerede plasmid- eller fagshuttlevektorer. Transgenerne indeholder reportergener til påvisning af forskellige typer mutationer induceret in vivo med testkemikalier.

3. Mutationer, der opstår hos en gnaver, bedømmes ved at genvinde transgenet og analysere reportergenets fænotype i en bakteriel vært, der er mangelfuld for reportergenet. TGR-genmutationsassays måler mutationer induceret i genetisk neutrale gener genvundet fra praktisk talt et hvilket som helst væv hos gnaveren. Disse assays omgår derfor mange af de eksisterende begrænsninger ved undersøgelsen af in vivo-genmutation i endogene gener (f.eks. begrænsede væv egnet til analyse, negativ/positiv udvælgelse i forhold til mutationer osv.).

4. »Weight of evidence« tyder på, at transgener reagerer på mutagener på samme måde som på endogene gener, især med hensyn til påvisning af baseparsubstitution, læserammeforskydninger samt små deletioner og insertioner (24).

5. International Workshops on Genotoxicity Testing (IWGT) har godkendt medtagelsen af TGR-genmutationassays til in vivo-påvisning af genmutationer og har anbefalet en protokol for deres gennemførelse (15)(29). Denne testmetode er baseret på disse anbefalinger. Yderligere analyse, som understøtter anvendelsen af denne protokol, findes i (16).

6. Det forventes, at det fremover kan være muligt at kombinere et TGR-genmutationsassay med en undersøgelse af toksicitet ved gentagen indgift (kapitel B.7 i dette bilag). Data skal dog sikre, at TGR-genmutationsassayets sensitivitet ikke påvirkes ved at afkorte tidsrummet mellem afslutningen på indgiftsperioden og prøvetagningsperioden med én dag, som det gøres i undersøgelsen af toksicitet ved gentagen indgift, sammenlignet med tre dage som brugt i TGR-genmutationsassayet. Der er også behov for data, som viser, at resultatet af assayet med gentagen indgift ikke påvirkes negativt ved at anvende en transgen stamme og ikke traditionelle gnaverstammer. Når disse data foreligger, vil testmetoden blive ajourført.

7. Definitioner af nøgletermer findes i bilaget.

INDLEDENDE OVERVEJELSER

8. TGR-genmutationsassays, hvortil der er tilstrækkelige data til rådighed til at understøtte deres brug i denne testmetode, er: lacZ bakteriofag mus (Mutaämus), lacZ plasmid mus, gpt delta (gpt og Spi$^-$) mus og rotte, lacI mus og rotte (Big Blue®), som gennemført under standardbetingelser. Desuden kan det cII-positive-udvælgelsesassay bruges til at evaluere mutationer i Big Blue® og Mutaä-musemodeller. Mutagenese hos TGR-modellerne vurderes normalt som mutanthyppighed. Om nødvendigt kan en molekylær analyse af mutationerne dog tilvejebringe supplerende oplysninger (se pkt. 24).

9. Disse in vivo-genmutationstest hos gnavere er særligt relevante for en vurdering af risikoen for mutationsfremkaldelse, idet reaktionerne i assayene afhænger af in vivo-metabolisme, farmakokinetik, DNA-reparationsprocesser og translesion-DNA-syntese, om end disse kan variere efter art, væv og type DNA-beskadigelse. Et in vivo-assay vedrørende genmutationer er ligeledes nyttigt til yderligere undersøgelse af mutagene virkninger, der er påvist af et in vitro-system, og til opfølgning på resultater af test, hvor der er anvendt andre in vivo-endepunkter (24). Ud over kausalt at være associeret med induktion af kræft er genmutation et relevant endepunkt for forudsigelse af mutationsbaserede ikkekræftsygdomme i somatiske væv (12) (13) samt sygdomme overført gennem kimcellelinjen.

10. Hvis der er tegn på, at testkemikaliet eller en relevant metabolit ikke når frem til væv af interesse, er det ikke relevant at foretage et TGR-genmutationsassay.

PRINCIP FOR TESTEN

11. I de assays, der er beskrevet i pkt. 8, er målgenets oprindelse bakteriel eller bakteriofag, og det genvindes fra gnaverens genomiske DNA ved at inkorporere transgenet i en λ-bakteriofag eller plasmid shuttlevektor. Proceduren omfatter ekstraktion af genomisk DNA fra det interessante gnavervæv, in vitro-behandling af det genomiske DNA (dvs. pakning af λ-vektorer eller ligering og elektroporering af plasmider for at genvinde shuttlevektoren) og efterfølgende påvisning af mutationer i bakterielle værter under passende forhold. I disse assays anvendes neutrale transgener, der uden problemer kan genvindes fra de fleste væv.

12. Basisforsøget vedrørende TGR-genmutation omfatter behandling af gnaveren med et kemikalie i et vist tidsrum. Kemikalier kan indgives på den mest egnede måde, herunder implantation (f.eks. test af medicinsk anordning). Det samlede tidsrum, hvor et dyr er doseret, betegnes indgiftsperioden. Indgift følges normalt af en periode forud for aflivning, hvor kemikaliet ikke længere indgives, og hvor ikkereparerede DNA-læsioner fikseres til stabile mutationer. I litteraturen er denne periode blevet betegnet på forskellig måde — manifestationstid, fikseringstid eller ekspressionstid. Tidsrummets afslutning er tidspunktet for prøvetagning (15) (29). Når dyret er aflivet, isoleres genomisk DNA fra væv af interesse og oprenses.

13. Data for et enkelt væv pr. dyr fra flere pakninger/ligeringer aggregeres almindeligvis, og mutanthyppigheden evalueres normalt ved hjælp af en total på mellem 10^5 og 10^7 plaquedannende eller kolonidannende enheder. Når der anvendes positive selektionsmetoder, bestemmes det samlede antal plaquedannende enheder med et særskilt sæt ikkeselektive plader.

14. Positive selektionsmetoder er udviklet for at lette påvisningen af mutationer i både gpt-genet [gpt-deltamus og -rotte, gpt^- fænotype (20) (22) (28)] og lacZ-gen [Muta™-mus eller lacZ-plasmid mus (3) (10) (11) (30)], mens lacI -genmutationer i Big Blue®-dyr påvises gennem en ikkeselektiv metode, der identificerer mutanter gennem dannelse af farvede (blå) plaques. Positiv selektionsmetodologi anvendes også til at påvise punktmutationer, der opstår i cII -genet i λ-bakteriofag shuttlevektoren [Big Blue®-mus eller -rotte og Muta™-mus (17)] og deletionsmutationer i λ red-og gam-gener [Spi^- selektion i gpt-deltamus og -rotte (21) (22) (28)]. Mutanthyppighed beregnes ved at dividere antallet af plaques/plasmider indeholdende mutationer i transgenet med det totale antal plaques/plasmider genvundet fra den samme DNA-prøve. I undersøgelser af TGR-genmutationer er mutanthyppigheden den rapporterede parameter. Desuden kan en mutationshyppighed bestemmes som fraktionen af celler, der bærer uafhængige mutationer. Denne beregning kræver korrektion for klonekspansion ved sekventering af de genvundne mutanter (24).

15. Mutationer, der er konstateret i lacI, lacZ, cII og gpt-punkt-mutationsassays, består primært af baseparsubstitutionsmutationer, læserammemutationer og små insertioner/deletioner. Disse mutationstypers relative andel af spontane mutationer svarer til, hvad der er konstateret for det endogene Hprt-gen. Store deletioner påvises kun med Spi^- selektionen og lacZ-plasmidassayene (24). Mutationer af interesse er in vivo-mutationer, der opstår hos musen eller rotten. In vivo- og ex vivo-mutationer, der kan opstå under fag-/plasmid-genvinding, -replikation eller --reparation, er relativt sjældne og kan i nogle systemer identificeres specifikt eller udelukkes af bakterieværten/det positive selektionssystem.

BESKRIVELSE AF METODEN

Forberedelser

Valg af dyreart

16. Der findes en lang række forskellige modeller til detektering af genmutation hos mus, og disse systemer er blevet bredere anvendt end modeller for transgene rotter. Hvis rotter tydeligvis er mere hensigtsmæssige modeller end mus (f.eks. i forbindelse med undersøgelser af mekanismen for carcinogenese for en tumor, der kun er konstateret i rotter, at korrelere med en toksicitetsundersøgelse for rotter, eller, hvis det vides, at rotters metabolisme er mere repræsentativ for menneskers metabolisme), bør brug af modeller for transgene rotter overvejes.

Miljø og fodringsbetingelser

17. Temperaturen i dyreforsøgslokalet bør ideelt være 22 °C (± 3 °C). Skønt den relative fugtighed bør være mindst 30 % og helst ikke overstige 70 % bortset fra under rengøring, bør målet være at sikre en konstant relativ fugtighed på 50-60 %. Belysningen bør være kunstig med 12 timers lys og 12 timers mørke. For så vidt angår fodring, kan der anvendes et konventionelt laboratoriefoder med ubegrænset adgang til vand. Valget af foder kan påvirkes af behovet for at sikre en passende tilblanding af et testkemikalie, når dette indgives ad denne vej. Dyr bør anbringes i små grupper (højst fem) af samme køn, hvis der ikke forventes aggressiv adfærd. Dyr kan opbevares individuelt, hvis dette er sagligt begrundet.

Klargøring af dyrene

18. Sunde, unge, seksuelt modne voksne dyr (8-12 uger ved start af behandling) udvælges vilkårligt til kontrol- og behandlingsgrupper. Dyrene identificeres unikt. Dyrene akklimatiseres til laboratorieforholdene i mindst fem dage. Burene indrettes på en sådan måde, at de mulige følger af burets placering minimeres. Ved undersøgelsens start bør variationen i dyrenes vægt være minimal og ikke overstige ± 20 % af gennemsnitsvægten for hvert køn.

Fremstilling af doser

19. Faste testkemikalier opløses eller suspenderes i passende opløsningsmidler eller vehikler eller iblandes foder eller drikkevand før indgift i dyrene. Flydende testkemikalier kan indgives direkte eller opløses før indgift. Til inhalationseksponering kan testkemikalier indgives som gas, damp eller en fast/flydende aerosol, afhængigt af deres fysisk-kemiske egenskaber. Der bør anvendes friske fremstillinger af testkemikaliet, medmindre stabilitetsdata påviser, at opbevaring er acceptabelt.

Testbetingelser

Opløsningsmiddel/vehikel

20. Opløsningsmidlet/vehiklet må ikke frembringe toksiske virkninger ved de anvendte dosismængder og må ikke mistænkes for at indgå i kemisk reaktion med testkemikaliet. Hvis der anvendes andre end velkendte opløsningsmidler/vehikler, skal deres anvendelse understøttes af referencedata om deres kompatibilitet. Det anbefales så vidt muligt først at overveje at anvende vandige opløsningsmidler/vehikler.

Positive kontroller

21. Samtidigt behandlede positive kontroldyr bør normalt anvendes. For laboratorier, der har godtgjort deres kompetence (se pkt. 23) og rutinemæssigt bruger disse assays, kan DNA fra tidligere behandlede positive kontroldyr indgå i hver undersøgelse for at bekræfte metodens succes. Sådant DNA fra tidligere forsøg bør hentes fra samme art og væv af interesse og opbevares korrekt (se pkt. 36). Når der anvendes samtidige positive kontroller, er det ikke nødvendigt at indgive dem ad samme vej som testkemikaliet, men det bør være kendt, at de positive kontroller fremkalder mutationer i et eller flere væv af interesse for testkemikaliet. Doserne af de positive kontrolkemikalier bør udvælges, således at de frembringer svage eller moderate virkninger med henblik på en kritisk vurdering af assayets udførelse og sensitivitet. Eksempler på positive kontrolkemikalier og nogle af deres målvæv findes i tabel 1.

Tabel 1

Eksempler på positive kontrolkemikalier og nogle af deres målvæv

Positivt kontrolkemikalie og CAS-nr.	EINECS-navn og EINECS-nr.	Specifikationer	Målvæv for mutationer	
			Rotte	Mus
N-ethyl-n-nitrosourinstof [CAS-nr. 759-73-9]	N-ethyl-n-nitrosourinstof [212-072-2]	Mutagen med direkte virkning	Lever, lunge	Knoglemarv, tyktarm, colon-epitel, tarm, lever, lunge, milt, nyre, ovarie-granulosaceller, hanlige kimceller

Positivt kontrolkemikalie og CAS-nr.	EINECS-navn og EINECS-nr.	Specifikationer	Målvæv for mutationer	
			Rotte	Mus
Ethylcarbamat (urethan) [CAS-nr. 51-79-6]	Urethan [200-123-1]	Mutagen, kræver metabolisme, men frembringer kun svage virkninger		Knoglemarv, formave, tyndtarm, lever, lunge, milt
2,4-diaminotoluen [CAS-nr. 95-80-7]	4-methyl-m-phenylen-diamin [202-453-1]	Mutagen, kræver metabolisme, også positiv i Spi⁻-assayet	Lever	Lever
Benzo[a]pyren [CAS-nr. 50-32-8]	Benzo[def]chrysen [200-028-5]	Mutagen, kræver metabolisme	Lever, væv,	Knoglemarv, bryst, tyktarm, formave, proventriculus, hjerte, lever, lunge, hanlige kimceller

Negative kontroller

22. Negative kontroller, kun behandlet med opløsningsmiddel eller vehikel og ellers behandlet på samme måde som behandlingsgrupperne, bør indgå for hver prøvetagningsperiode. Hvis der ikke foreligger historiske eller offentliggjorte kontroldata, som viser, at det valgte opløsningsmiddel/vehikel ikke fremkalder skadelige eller mutagene virkninger, bør ubehandlede kontroller også indgå for hver prøvetagningsperiode for at sikre godkendelse af vehikelkontrollen.

Kontrol af laboratoriets kompetence

23. Kompetence med hensyn til disse assays bør fastslås ved godtgørelse af kapaciteten til at reproducere forventede resultater ud fra offentliggjorte data (24) for: 1) mutanthyppigheder med positive kontrolkemikalier (inkl. svage reaktioner) såsom dem, der er anført i tabel 1, ikkemutagener og vehikelkontroller og 2) genvinding af transgener fra genomisk DNA (f.eks. pakningseffektivitet).

Sekventering af mutanter

24. Til regulatoriske anvendelser er DNA-sekventering af mutanter ikke nødvendig, især ikke hvor der er opnået et klart positivt eller negativt resultat. Datasekventering kan dog være nyttig, når der observeres stor variation mellem dyrene. I disse tilfælde kan sekventering anvendes til at udelukke muligheden af »jackpots« eller klonhændelser ved at identificere andelen af unikke mutanter fra et bestemt væv. Sekventering af ca. 10 mutanter pr. væv pr. dyr burde være nok til blot at fastslå, om klonmutanter bidrager til mutanthyppigheden. Sekventering af op til 25 mutanter kan være nødvendig for at korrigere mutanthyppigheden matematisk for klonalitet. Sekventering af mutanter kan også overvejes, når der konstateres små stigninger i mutanthyppighed (som lige overstiger de ubehandlede kontrolværdier). Forskelle i mutantspektret mellem mutantkolonierne fra behandlede og ubehandlede dyr kan støtte en mutagen virkning (29). Mutationsspektre kan også anvendes til udvikling af mekanistiske hypoteser. Når sekventering skal indgå i undersøgelsesprotokollen, skal der udvises særlig omhyggelighed med udformningen af sådanne undersøgelser, især i henseende til antallet af mutanter, der sekventeres pr. prøve, for at opnå tilstrækkelig virkning ifølge den statistiske model, der er anvendt (se pkt. 43).

FREMGANGSMÅDE

Dyrenes antal og køn

25. Antallet af dyr pr. gruppe bør fastlægges på forhånd, så der er nok til at opnå den nødvendige statistiske styrke til at påvise mindst én fordobling af mutanthyppigheden. Med hensyn til størrelse består en gruppe af mindst fem dyr. Hvis den statistiske styrke ikke er tilstrækkelig, øges antallet af dyr dog efter behov. Der bør normalt anvendes handyr. Der kan være tilfælde, hvor det er berettiget kun at teste hundyr. Det gælder f.eks., når der testes lægemidler beregnet for kvinder, eller når man undersøger kvindespecifik metabolisme. Hvis der er signifikante forskelle mellem kønnene i henseende til toksicitet eller metabolisme, skal der anvendes både hanner og hunner.

Indgiftsperiode

26. Baseret på observationer af, at mutationer akkumuleres med hver behandling, er et regimen med gentagen dosis nødvendig — med daglige behandlinger i en periode på 28 dage. Dette anses almindeligvis for acceptabelt til både generering af en tilstrækkelig akkumulering af mutationer af svage mutagener og til sikring af en eksponeringstid, der er tilstrækkelig til at påvise mutationer i langsomt opformerende organer. Alternative behandlingsprogrammer kan være egnede til visse evalueringer, og disse alternative doseringsplaner begrundes sagligt i protokollen. Behandlinger bør ikke være kortere end den tid, der skal anvendes til den fuldstændige induktion af alle de relevante metaboliserende enzymer, og kortere behandlinger kan kræve brug af flere prøvetagningsperioder, der passer til organer med forskellige formeringsgrader. Under alle omstændigheder skal al tilgængelig information (f.eks. om generel toksicitet eller metabolisme og farmakokinetik) bruges i begrundelsen for en protokol, især i forbindelse med afvigelser fra ovenstående standardanbefalinger. Behandlingstider på over otte uger kan øge sensitiviteten, men bør forklares tydeligt og begrundes, eftersom lange behandlingstider kan frembringe en tilsyneladende stigning i mutanthyppigheden gennem klonekspansion (29).

Dosisstørrelse

27. Dosisstørrelsen baseres på resultaterne af en dosis-range-finding-undersøgelse med måling af den generelle toksicitet, som gennemført med anvendelse af samme eksponeringsmåde, eller baseres på resultaterne af allerede eksisterende subakutte toksicitetsundersøgelser. Ikketransgene dyr af samme gnaverstamme kan anvendes til at bestemme dosisintervaller. For at tilvejebringe information om dosisreaktion (se pkt. 28) bør hovedundersøgelsen omfatte en fuldstændig undersøgelse, der omfatter en negativ kontrolgruppe (se pkt. 22) og mindst tre dosisniveauer med passende indbyrdes afstand, undtagen hvor grænsedosis er anvendt. Topdosis bør være den maksimalt tolererede dosis (MTD). MTD defineres som den dosis, der frembringer tegn på toksicitet, som indicerer, at højere dosisniveauer baseret på samme doseringsplan ville forventes at medføre letalitet. Kemikalier med specifikke biologiske aktiviteter ved lave ikketoksiske doser (såsom hormoner og mitogener) og kemikalier, der udviser mætning af toksikokinetiske egenskaber, kan være undtagelser fra doseringskriterierne og bør evalueres på ad hoc-basis. De anvendte dosisniveauer bør dække et interval fra maksimal til lav eller ingen toksicitet.

Grænsetest

28. Hvis dosis-range-finding-undersøgelser eller eksisterende data fra relaterede gnaverstammer indicerer, at en behandlingsplan med mindst grænsedosis (se nedenfor) ikke udløser observerbare toksiske virkninger, og hvis genotoksicitet ikke ville være forventelig på grundlag af data fra strukturelt beslægtede kemikalier, betragtes en fuldstændig undersøgelse under anvendelse af tre dosisniveauer ikke som nødvendig. For en indgiftsperiode på 28 dage (dvs. 28 daglige behandlinger) er grænsedosis 1 000 mg/kg kropsvægt/dag. For indgiftsperioder på 14 dage eller mindre er grænsedosis 2 000 mg/kg/kropsvægt/dag (doseringsplaner, der ikke omfatter 28 daglige behandlinger, bør begrundes sagligt i protokollen, se pkt. 26).

Indgift af doser

29. Testkemikaliet indgives normalt ved tvangsfodring med sonde eller en passende intubationskanyle. Generelt bør den forventede indgiftsmåde for mennesker overvejes i forbindelse med udformningen af et assay. Andre indgiftsmåder (såsom drikkevand, subkutant, intravenøst, topisk, inhalation, intratrachealt, i kost eller implantation) kan accepteres, hvis de kan begrundes. Intraperitoneal injektion anbefales ikke, da det ikke er en fysiologisk relevant måde for human eksponering. Hvor stor en væskemængde der kan indgives ad gangen ved tvangsfodring eller injektion, afhænger af forsøgsdyrenes størrelse. Mængden bør højst være på 2 ml/100 g kropsvægt. Anvendelse af større rumfang begrundes. Bortset fra lokalirriterende eller ætsende stoffer, som normalt vil have kraftigere virkninger ved højere koncentrationer, bør testvolumenet variere så lidt som muligt, idet koncentrationen justeres, så volumenet bliver det samme ved alle dosisniveauer.

Prøveudtagningstid

Somatiske celler

30. Prøveudtagningstiden er en kritisk variabel, fordi den bestemmes af den periode, der medgår til mutationernes fiksering. Denne periode er vævsspecifik og ser ud til at afhænge af cellepopulationens omdannelsestid, hvor knoglemarv og tarm er hurtige respondenter og leveren meget langsommere. Et egnet kompromis for måling af

mutanthyppighed i både hurtigt og langsomt formerende væv er 28 fortløbende daglige behandlinger (som anført i pkt. 26) og prøveudtagning tre dage efter den sidste behandling, selv om den maksimale mutanthyppighed ikke nødvendigvis viser sig i langsomt formerende væv under disse forhold. Hvis langsomt formerende væv er af særlig betydning, kan en senere prøveudtagningstid på 28 dage efter indgiftsperioden på 29 dage være mere hensigtsmæssig (16) (29). I sådanne tilfælde erstatter den senere prøveudtagning den tre dage lange prøveudtagningstid og kræver saglig begrundelse.

Kimceller

31. TGR-assays er velegnede til at undersøge induktion af genmutation i hanlige kimceller (7) (8) (27), hvor tidsintervaller og kinetik for spermatogenese er veldefineret (27). Det lave antal æg, der er tilgængelige for analyse, selv efter super-ovulation, og det forhold, at der ikke er en DNA-syntese i oocytten, udelukker bestemmelse af mutation i hunlige kimceller under anvendelse af transgene assays (31).

32. Prøveudtagningstiden for hanlige kimceller bør fastlægges på en sådan måde, at der udtages prøve af de udsatte celletyper igennem hele kimcelleudviklingen, og at det stadium, der er mål for udtagningen, er blevet tilstrækkeligt eksponeret. Udviklingen af kimceller fra spermatogonie-stamceller til moden sperma, der når vas deferens/cauda epididymis, er ~49 dage for mus (36) og ~70 dage for rotter (34) (35). Efter eksponering i 28 dage med en efterfølgende prøveudtagningsperiode på tre dage udgør akkumuleret sperma fra vas deferens/cauda epididymis (7)(8) en cellepopulation, der har været eksponeret i omtrent sidste halvdel af spermatogenesen, som omfatter den meiotiske og postmeiotiske periode, men ikke spermatogonie- eller kimcelleperioden. For at sikre tilstrækkelig udtagning af celler i vas deferens/cauda epididymis, der var spermatogonie-kimceller i eksponeringsperioden, er der behov for en yderligere prøveudtagningsperiode på mindst syv uger (mus) eller 10 uger (rotter) efter behandlingens afslutning.

33. Celler, der er ekstruderet fra sædkanaler efter behandling i 28 + 3 dage, omfatter en blandet population, der er beriget for alle stadier i kimcellernes udvikling (7) (8). Prøveudtagning af disse celler med henblik på påvisning af genmutation giver ikke en lige så nøjagtig vurdering af de stadier, hvor der induceres kimcellemutationer, som ved prøveudtagning af spermatozooer fra vas deferens/cauda epididymis (eftersom et interval af kimcelletyper er udtaget fra kanalerne, og nogle af de somatiske celler vil kontaminere denne cellepopulation). Prøveudtagning af celler fra sædkanaler ud over spermatozooer fra vas deferens/cauda epididymis efter en prøveudtagningsperiode på kun 28 + 3 dage vil dog give en vis dækning af eksponerede celler på tværs af de fleste faser i kimcelleudviklingen og kan være nyttig med hensyn til påvisning af visse kimcellemutagener.

Bemærkninger

34. Der bør foretages generelle kliniske observationer mindst én gang om dagen, fortrinsvis på samme tidspunkt(er) hver dag og under hensyntagen til det tidspunkt, hvor de forventede virkninger efter dosering topper. Dyrenes helbredstilstand registreres. Alle dyr observeres mindst to gange dagligt for morbiditet og mortalitet. Alle dyr vejes mindst én gang om ugen og ved aflivning. Foderindtag måles mindst én gang ugentligt. Hvis testkemikaliet indgives via drikkevandet, måles vandindtaget ved hvert vandskift og mindst én gang ugentligt. Dyr, der udviser ikkedødelig indikation for for høj toksicitet, bør aflives før testperiodens udløb (23).

Opsamling af væv

35. Rationalet for at indsamle væv beskrives klart. Eftersom det er muligt at undersøge mutationsinduktion i næsten alle væv, bør udvælgelse af det væv, der skal indsamles, være baseret på begrundelsen for, at man foretager undersøgelsen, og evt. eksisterende data om mutagenicitet, carcinogenicitet eller toksicitet for det undersøgte kemikalie. Vigtige faktorer, der bør indgå i overvejelserne, er indgiftsmåde (baseret på sandsynlige humane eksponeringsveje), den forventede vævsdistribution og den mulige handlingsmekanisme. Findes der ikke baggrundsinformation, bør der indsamles flere somatiske væv, som kan være af interesse. Der bør være eksempler på hurtigt og langsomt formerende væv og kontaktstedsvæv. Desuden bør der indsamles og lagres spermatozoer fra vas deferens/cauda epididymis og celler i udvikling fra sædkanalerne (som beskrevet i pkt. 32 og 33), hvis det senere skulle blive nødvendigt at analysere kimcellemutagenicitet. Organer vejes, og for større organer bør samme område indsamles for alle dyr.

Opbevaring af væv og DNA

36. Væv (eller vævshomogenater) skal opbevares ved eller under – 70 °C og bruges til isolation af DNA inden for fem år. Isoleret DNA, opbevaret nedkølet ved 4 °C i dertil egnede buffere, bør optimalt anvendes til mutationsanalyse inden for et år.

Udvælgelse af væv til mutantanalyse

37. Valg af væv baseres på følgende overvejelser: 1) indgiftsmåde eller første kontaktsted (f.eks. proventriculus, hvis indgift sker oralt, lunge, hvis indgift sker gennem inhalation, eller hud, hvis der er anvendt topisk påføring) og 2) farmakokinetiske parametre observeret i generelle toksicitetsundersøgelser, der indicerer konfiguration, retention og akkumulering af væv, eller målorganer for toksicitet. Hvis der foretages opfølgende undersøgelser til carcinogenicitetsundersøgelser, bør det overvejes at anvende målvæv for carcinogenicitet. Valget af væv til analyse skal maksimere påvisningen af kemikalier med direkte virkende in vitro-mutagener, som hurtigt metaboliseres, er yderst reaktive eller dårligt absorberede, eller kemikalier, for hvilke målvævet bestemmes af indgiftsmåden (6).

38. I mangel af baggrundsinformation og under hensyntagen til kontaktstedet, der bestemmes af indgiftsmåden, skal leveren og mindst ét hurtigt delende væv (f.eks. proventiculus eller knoglemarv) vurderes for mutagenicitet. I de fleste tilfælde kan ovenstående krav opfyldes med analyser af to omhyggeligt udvalgte væv, men i nogle tilfælde er der behov for tre eller flere. Hvis der er grund til at være specifikt bekymret over kimcellevirkninger, herunder positive reaktioner i somatiske celler, vurderes kimcellevæv for mutationer.

Målemetoder

39. Der findes sædvanlige laboratoriemetoder eller offentliggjorte metoder til påvisning af mutanter for de anbefalede transgene modeller: lacZ lambda bakteriofag og plasmid (30), lacI-mus (2) (18), gpt-deltamus (22), gpt-deltarotte (28), cII (17). Modifikationer begrundes og dokumenteres. Data fra flere pakninger kan aggregeres og bruges til at opnå et tilstrækkeligt antal plaques eller kolonier. Behovet for et stort antal pakningsreaktioner for at opnå det rigtige antal plaques kan være en indikation for dårlig DNA-kvalitet. I sådanne tilfælde skal data behandles med forsigtighed, da de kan være upålidelige. Det optimale samlede antal plaques eller kolonier pr. DNA-prøve bestemmes af den statistiske sandsynlighed for at påvise tilstrækkelig mange mutanter ved en given spontan mutanthyppighed. Generelt kræver det mindst 125 000-300 000 plaques, hvis den spontane mutanthyppighed er i størrelsesordenen 3×10^{-5} (15). For Big Blue® lacI-assayet er det vigtigt at påvise, at hele rækken af mutantfarvefænotyper kan påvises ved at inddrage et relevant antal farvekontroller i hver udpladning. Væv og deraf følgende prøver (emner) behandles og analyseres ved hjælp af et blokforsøg, hvor emner fra vehikel-/opløsningsmiddelkontrolgruppen, den positive kontrolgruppe (evt.) eller positivt kontrol-DNA (hvor det er relevant), og hver behandlingsgruppe behandles sammen.

DATA OG RAPPORTERING

Behandling af resultater

40. Individuelle dyredata fremlægges i tabelform. Forsøgsenheden er dyret. Rapporten skal omfatte det samlede antal plaquedannende enheder (pfu) eller kolonidannende enheder (cfu), antal mutanter samt mutanthyppighed for hvert væv fra hvert dyr. Hvis der er flere paknings-/redningsreaktioner, skal antallet af reaktioner pr. DNA rapporteres. Der skal indhentes data for hver enkelt reaktion, men kun det samlede antal pfu eller cfu skal anføres. Data om toksicitet og kliniske tegn skal anføres, jf. pkt. 34. Evt. sekventeringsresultater fremlægges for hver analyseret mutant, og deraf følgende beregninger af mutationshyppighed for hvert dyr og væv skal vises.

Statistisk evaluering og fortolkning af resultater

41. Der findes flere kriterier for fastlæggelse af et positivt resultat såsom en dosisrelateret stigning i mutanthyppigheden eller en klar stigning i mutanthyppigheden i en enkelt dosisgruppe sammenlignet med opløsningsmiddel-/vehikelkontrolgruppen. Mindst tre behandlede dosisgrupper skal analyseres for at tilvejebringe tilstrækkelige data til analyse af dosisreaktion. Mens resultaternes biologiske relevans skal være det primære hensyn, kan der benyttes statistiske metoder som en hjælp til at evaluere testresultaterne (4) (14) (15) (25) (26). I de anvendte statistiske test skal dyret betragtes som forsøgsenheden.

42. Et testkemikalie, for hvilket resultaterne ikke opfylder ovenstående kriterier for et væv, betragtes som ikkemutagent i dette assay. Med hensyn til den biologiske relevans af et negativt resultat skal vævets eksponering bekræftes.

43. Med hensyn til DNA-sekventeringsanalyser findes der en række statistiske metoder, som kan anvendes til at fortolke resultaterne (1) (5) (9) (19).

44. Overvejelser om, hvorvidt de observerede værdier ligger inden eller uden for det historiske kontrolområde, kan være retningsgivende for evalueringen af reaktionens biologiske signifikans (32).

Testrapport

45. Testrapporten skal indeholde følgende oplysninger:

Testkemikalie

— identifikationsdata og CAS-nummer, hvis kendt

— kilde, source, referencenummer, hvis muligt

— fysiske egenskaber og renhedsgrad

— fysisk-kemiske egenskaber af relevans for undersøgelsens gennemførelse

— testkemikaliets stabilitet, hvis kendt.

Opløsningsmiddel/vehikel

— begrundelse for valg af vehikel

— testkemikaliets opløselighed og stabilitet i opløsningsmidlet/vehiklet, hvis kendt

— fastlæggelse af sammensætning af diæt, drikkevand eller inhalationspræparat

— analytisk bestemmelse af sammensætninger (f.eks. stabilitet, homogenitet, nominel koncentration).

Testdyr

— anvendt art/stamme og begrundelse herfor

— dyrenes antal, alder og køn

— kilde, miljøbetingelser, føde osv.

— dyrenes individuelle vægt ved forsøgets start, herunder interval for kropsvægt, middel- og standardafvigelse for hver gruppe.

Testbetingelser

— positive og negative (vehikel/opløsningsmiddel) kontroldata

— data fra range-finding-undersøgelse

— rationale for valg af dosismængde

— detaljer vedrørende fremstilling af testkemikaliet

— detaljer vedrørende indgift af testkemikaliet

— rationale for indgiftsmåde

— metoder for måling af animalsk toksicitet, herunder om muligt histopatologiske eller hæmatologiske analyser samt hyppighed for observationer og kropsvejninger

— metoder til kontrol af, at testkemikaliet nåede målvævet, eller generel cirkulation, hvis der er opnået negative resultater

— faktisk dosis (mg/kg kropsvægt/dag) beregnet på baggrund af testkemikaliets koncentration i foder/drikkevand (ppm) og forbrug, hvis relevant

— detaljer vedrørende foder og vandkvalitet

— detaljeret beskrivelse af behandling og prøveudtagningsplaner samt begrundelser for valg

— aflivningsmetode

— procedurer for isolering og bevaring af væv

— metoder for isolering af gnaveres genomiske DNA, elimination af transgener fra genomisk DNA og overførsel af transgent DNA til en bakterievært

— kilde og partinummer for alle celler, kits og reagenser (hvis relevant)

— metode til kvantitativ bestemmelse af mutanter

— metoder til molekylær analyse af mutanter og anvendelse til korrektion for klonalitet og/eller beregning af mutationshyppighed, hvis relevant.

Resultater

— dyrs tilstand før og i løbet af testperioden, herunder tegn på toksicitet

— krops- og organvægt ved aflivning

— for hvert væv/dyr, antal mutanter, antal af evaluerede plaques eller kolonier, mutanthyppighed

— for hver vævs-/dyregruppe, antal pakningsreaktioner pr. DNA-prøve, totalt antal af mutanter, gennemsnitlig mutanthyppighed, standardafvigelse

— forhold mellem dosis-respons, hvor muligt

— for hvert væv/dyr, antal uafhængige mutanter og gennemsnitlig mutanthyppighed, hvis der er foretaget molekylær analyse

— sideløbende og historisk negative kontroldata med intervaller samt middel- og standardafvigelser

— samtidige positive kontroldata (eller ikkesamtidige positiv DNA-kontroldata)

— analytiske bestemmelser, hvis tilgængelige (f.eks. DNA-koncentrationer brugt i pakning, DNA-sekventeringsdata)

— statistiske analyser og anvendte metoder.

Diskussion af resultaterne

Konklusion

LITTERATUR

1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987). »Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra«, J. Mol. Biol., 194: 391-396.

2) Bielas, J.H. (2002). »A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement«, Mutation Res., 518: 107-112.

3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995). »Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying in vivo Mutations« Nature, 377(6550): 657-659

4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995). »Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice«, Environ. Mol. Mutagen, 25(3): 246-255.

5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996). »Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency«, Environ. Mol. Mutagen, 28: 405-413.

6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999). »Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing in vivo for the Detection of Site-of-contact Mutagens«, Mutagenesis, 14(1): 141-151.

7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995). »Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of lacZ Transgenic Mice«, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7485-7489.

8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997). »Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells«, Mutation Res., 388(2-3): 197-212.

9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000). »Bayesian Analysis of Mutational Spectra«, Genetics, 156: 1411-1418.

10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989). »Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations in vivo«, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(20): 7971-7975.

11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993). »A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive E. coli Host«, Biotechniques, 14(3): 326, 330.

12) Erikson, R.P. (2003). »Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer«, Mutation Res., 543: 125-136.

13) Erikson, R.P. (2010). »Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update«, Mutation Res., **705: 96-106**.

14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998). »Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™-Mouse Mutagenicity Assays«, Mutagenesis, 13(3): 249-255.

15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), »In vivo Transgenic Mutation Assays«, Environ. Mol. Mutagen., 35: 253-259.

16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003). »Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays«, Environ. Mol. Mutagen., 41: 1-6.

17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996). »Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for in vivo Mutations in a Bacteriophage λ Transgene TARGET«, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(17): 9073-9078.

18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990). »The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing«, Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212-218.

19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008). »Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis«, Carcinogenesis, 29(4): 772-778.

20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996). »A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi — and 6-thioguanine Selections«, Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465-470.

21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999). »Spi$^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice«, Environ. Mol. Mutagen., 34(1): 9-15.

22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000). »Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays«, Mutation Res., 455(1–2): 191-215.

23) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, Nº19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

24) OECD (2009). Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, Nº 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.

25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995). »Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay«, Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231-245.

26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, … G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997). »Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study«, Mutation. Res., 388(2–3): 249-289.

27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006). »Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays«, Mutation. Res., 598: 164-193.

28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010). »Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers«, Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003). »In vivo Transgenic Mutation Assays«, Mutation Res., 540: 141-151.

30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996). »Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations in vivo« in: G. Pfeifer (ed.), Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005). »A lacZ Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells«, Mutation Res., 578(1-2): 117-123.

32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011). »Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data«, Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

33) OECD (2011). Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, Nº 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.

(34) Clermont, Y. (1972). »Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal«. Physiol. Rev. 52: 198-236.

35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006). »The Epididymis«, in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R. G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071-1148.

36) Russell, L.B. (2004). »Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse«, Genetica, 122: 25-36.

Tillæg

DEFINITIONER

Indgiftsperiode: samlet periode, i hvilken et dyr doseres.

Baseparsubstitution: en type mutation, der forårsager erstatning af en enkelt DNA-nukleotidbase med en anden DNA-nukleotidbase.

Capsid: den proteinskal, der omgiver en viruspartikel.

Kemikalie: et stof eller en blanding.

Klonal ekspansion: fremstilling af mange celler fra en enkelt (mutant) celle.

Kolonidannende enhed (cfu): måling af antal levedygtige bakterier.

Concatamer: et langt kontinuerligt biomolekyle bestående af flere identiske kopier forbundet i serier.

Cos-site: et enkeltstrenget DNA med 12 nukleotider, der findes i begge ender af den bakteriofage lambdas dobbeltstrengede genom.

Deletion: en mutation, hvor genomet mister en eller flere (sekventielle) nukleotider.

Elektropolering: påføring af elektriske impulser for at øge cellemembranernes gennemtrængelighed.

Endogent gen: et gen, der hører til genomet.

Extra-binomial variation: større variabilitet i gentagne skøn over en populationsandel, der ville være forventet, hvis populationen havde en binomial fordeling.

Læserammemutation: en genetisk mutation forårsaget af insertioner eller deletioner af et antal nukleotider, der ikke er deleligt med tre, i en DNA-sekvens, der koder for et protein/peptid.

Insertion: tilføjelse af et eller flere nukleotidbasepar i en DNA-sekvens.

Jackpot: et stort antal mutanter, der er opstået gennem klonekspansion fra en enkelt mutation.

Store deletioner: deletioner i DNA af en eller flere kilobaser (der er effektivt deleteret med Spi ⁻ selektionen og lacZ-plasmidassays).

Ligering: den kovalente forbinding af to ender af DNA-molekyler under anvendelse af DNA-base.

Mitogen: et kemikalie, der stimulerer en celle til at igangsætte celledeling og udløser mitose (dvs. celledeling).

Neutralt gen: et gen, der ikke påvirkes af positive eller negative selektive pres.

Pakning: syntese af infektiøse fag-partikler fra et præparat af fag-capsider og haleproteiner og en concatamer af DNA-fag-molekyler. Almindeligt brugt til at pakke DNA klonet på en lambdavektor (adskilt af cos-sites) i infektiøse lambdapartikler.

Pakningseffektivitet: den effektivitet, hvormed pakkede bakteriofager genvindes i værtsbakterier.

Plaquedannende enhed (pfu): måling af antal levedygtige bakteriofag.

Punktmutation: en generel term for en mutation, der kun påvirker en lille sekvens DNA, herunder små insertioner, deletioner og basesubstitutioner.

Positiv udvælgelse: en metode, der tillader, at kun mutanter overlever.

Reportergen: et gen, hvis mutantgenprodukt er let at påvise.

Prøveudtagningstid: afslutningen på det tidsrum forud for aflivning, hvor kemikaliet ikke indgives, og hvor ubearbejdede DNA-skader fikseres i stabile mutationer.

Shuttlevektor: en vektor, der er er udformet, så den kan opformere to forskellige værtsarter. Følgelig kan DNA indsat i en shuttlevektor testes eller manipuleres i to forskellige celletyper eller to forskellige organismer.

Testkemikalie: Alle stoffer eller blandinger, der testes ved hjælp af denne testmetode.

Transgene: af, relateret til eller værende en organisme, hvis genom allerede er blevet ændret ved overførsel af et gen eller gener fra en anden art.«