

II

(Ne teisėkūros procedūra priimami aktai)

REGLAMENTAI

KOMISIJOS REGLAMENTAS (ES) Nr. 900/2014

2014 m. liepos 15 d.

kuriuo iš dalies keičiamas Reglamentas (EB) Nr. 440/2008, nustatantis bandymų metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH) siekiant jį suderinti su technikos pažanga

(Tekstas svarbus EEE)

EUROPOS KOMISIJA,

atsižvelgdama į Sutartį dėl Europos Sąjungos veikimo,

atsižvelgdama į 2006 m. gruodžio 18 d. Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH), įsteigiantį Europos cheminių medžiagų agentūrą, iš dalies keičiantį Direktyvą 1999/45/EB bei panaikinantį Tarybos reglamentą (EEB) Nr. 793/93, Komisijos reglamentą (EB) Nr. 1488/94, Tarybos direktyvą 76/769/EEB ir Komisijos direktyvas 91/155/EEB, 93/67/EEB, 93/105/EB bei 2000/21/EB ⁽¹⁾, ypač į jo 13 straipsnio 2 dalį,

kadangi:

- (1) Komisijos reglamente (EB) Nr. 440/2008 ⁽²⁾ yra išdėstyti pagal Reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 taikytini bandymų metodai, skirti cheminių medžiagų fizikinėms ir cheminėms savybėms, taip pat toksiškumui ir ekotoksiškumui nustatyti;
- (2) Reglamentą (EB) Nr. 440/2008 būtina atnaujinti – įtraukti EBPO neseniai patvirtintus prioritetinius naujus ir atnaujintus bandymų metodus, taip siekiant atsižvelgti į technikos pažangą ir užtikrinti, kad, laikantis Europos Parlamento ir Tarybos direktyvos 2010/63/ES ⁽³⁾ nuostatų, bandymų tikslais būtų naudojama mažiau gyvūnų. Dėl šio projekto konsultuotasi su suinteresuotaisiais subjektais;
- (3) šį reglamento pritaikymą prie techninės pažangos sudaro šeši nauji bandymų metodai, skirti toksiniam ir kitokiam poveikiui sveikatai nustatyti; tai – toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi tyrimas, išplėstinis toksinio poveikio vienos kartos dauginimuisi tyrimas, transgeninių graužikų *in vivo* genų mutacijos analizė, *in vitro* poveikio steroidinių hormonų sintezei įvertinimo bandymas ir du *in vivo* estrogeninio ir (anti)androgeninio poveikio įvertinimo metodai;
- (4) todėl Reglamentą (ES) Nr. 440/2008 reikėtų atitinkamai iš dalies pakeisti;
- (5) šio reglamento nuostatos atitinka pagal Reglamento (EB) Nr. 1907/2006 133 straipsnį įsteigto komiteto nuomonę,

⁽¹⁾ OL L 396, 2006 12 30, p. 1.

⁽²⁾ 2008 m. gegužės 30 d. Komisijos reglamentas (EB) Nr. 440/2008, nustatantis bandymo metodus pagal Europos Parlamento ir Tarybos reglamentą (EB) Nr. 1907/2006 dėl cheminių medžiagų registracijos, įvertinimo, autorizacijos ir apribojimų (REACH) (OL L 142, 2008 5 31, p. 1).

⁽³⁾ 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/EB dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (OL L 276, 2010 10 20, p. 33).

PRIĖMĖ ŠĮ REGLAMENTĄ:

1 straipsnis

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas pagal šio reglamento priedą.

2 straipsnis

Šis reglamentas įsigalioja trečią dieną nuo jo paskelbimo *Europos Sąjungos oficialiajame leidinyje*.

Šis reglamentas privalomas visas ir tiesiogiai taikomas visose valstybėse narėse.

Priimta Briuselyje 2014 m. liepos 15 d.

Komisijos vardu

Pirmininkas

José Manuel BARROSO

PRIEDAS

Reglamento (EB) Nr. 440/2008 priedas iš dalies keičiamas taip:

Įterpiami B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 ir B.58 skyriai:

„B.53. TOKSINIO POVEIKIO NERVŲ SISTEMOS VYSTYMUISI TYRIMAS

ĮŽANGA

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. *OECD Test Guideline (TG)*) Nr. 426 (2007). 1995 m. birželio mėn. Kopenhagoje EBPO Toksinio poveikio dauginimuisi ir vystymuisi tyrimo darbo grupė aptarė poreikį atnaujinti esamas EBPO toksinio poveikio dauginimuisi ir vystymuisi bandymų gaires ir parengti naujas dar neapartytą vertinamųjų baigčių bandymų gaires (1). Darbo grupė rekomendavo toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi bandymų gaires rengti remiantis JAV aplinkos apsaugos agentūros (angl. US EPA) gairėmis; šios gairės nuo to laiko buvo pakeistos (2). 1996 m. birželio mėn. Kopenhagoje įvyko antras konsultacinis posėdis, surengtas siekiant padėti Sekretariatui rengti naujų toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi bandymo gairių projektą, taip pat patarti dėl pagrindinių šių gairių punktų, pavyzdžiui, dėl dalykų, susijusių su gyvūnų rūšių pasirinkimu, dozių davimo laikotarpiu, bandymo laikotarpiu, vertinamosiomis baigtimis ir rezultatų vertinimo kriterijais. JAV toksinio poveikio nervų sistemai rizikos vertinimo gairės paskelbtos 1998 m. (3). EBPO ekspertų konsultacinis posėdis ir Tarptautinio gyvybės mokslų instituto (angl. ILSI) Rizikos mokslų instituto seminaras surengtas 2000 m. spalio mėn., ekspertų konsultacinis posėdis įvyko 2005 m. Tokijuje. Šie posėdžiai surengti moksliniams ir techniniams klausimams, susijusiems su esamomis bandymų gairėmis, aptarti; rengiant šį bandymų metodą atsižvelgta į per posėdžius pateiktas rekomendacijas (4) (5) (6) (7). Papildoma informacija apie šio bandymų metodo taikymą, aiškinimą ir terminus pateikiama EBPO Rekomendaciniame dokumente (angl. *OECD Guidance Document*) Nr. 43 „Reproductive Toxicity Testing and Assessment“ (8) ir Nr. 20 „Neurotoxicity Testing“ (9).

PRADINIAI ASPEKTAI

2. Yra žinoma, kad kai kurios cheminės medžiagos daro toksišką poveikį žmonių ir kitų rūšių gyvūnų nervų sistemos vystymuisi (10) (11) (12) (13). Galimą cheminės medžiagos toksišką poveikį nervų sistemos vystymuisi gali prireikti nustatyti tam, kad būtų galima nustatyti ir įvertinti cheminės medžiagos toksines savybes. Toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi tyrimų tikslas – surinkti duomenis, įskaitant duomenis apie dozių ir atsako ryšio ypatumus, apie galimą funkcinį ir morfologinį poveikį palikuonių nervų sistemos vystymuisi, galintį atsirasti toms medžiagoms palikuonis veikiant gimdoje ir gyvenimo pradžioje.
3. Toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi tyrimą galima atlikti kaip atskirą tyrimą, įtraukti į toksinio poveikio dauginimuisi ir (arba) toksinio poveikio suaugusių gyvūnų nervų sistemai tyrimą (pvz., B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16) bandymų metodai) arba sujungti su toksinio poveikio prenataliniam vystymuisi tyrimu (pvz., B.31 bandymų metodas (17)). Jeigu toksinio poveikio nervų sistemos vystymuisi tyrimas įtraukiamas į kitą tyrimą arba sujungiamas su kitu tyrimu, būtina išlaikyti abiejų rūšių tyrimų vientisumą. Visi bandymai turėtų atitikti taikomus teisės aktus, valdžios institucijų ir įstaigų gaires dėl laboratorinių gyvūnų naudojimo moksliniams tyrimams (pvz., 18).
4. Bandymų laboratorijos darbuotojai, prieš atlikdami tyrimą, turėtų susipažinti su visa turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą. Ši informacija – tai cheminės medžiagos tapatumas ir struktūra, jos fizikinės ir cheminės savybės, visų kitų cheminės medžiagos *in vitro* arba *in vivo* toksinio poveikio bandymų rezultatai, giminingos struktūros cheminių medžiagų toksikologiniai duomenys ir numatomas (-i) medžiagos naudojimo būdas (-ai). Ši informacija yra reikalinga, kad visiems suinteresuotiesiems asmenims būtų įrodyta, jog bandymas yra svarbus žmonių sveikatai saugoti ir padės pasirinkti tinkamą pradinę dozę.

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

5. Bandomoji cheminė medžiaga duodama gyvūnams gestacijos ir laktacijos laikotarpiu. Bandymai su motininėmis patelėmis atliekami siekiant įvertinti poveikį vaikingoms ir žindančioms patelėms, jie taip pat gali suteikti palyginamosios informacijos (motininės patelės *versus* palikuonys). Palikuonys toksiniam poveikiui nervų sistemos vystymuisi įvertinti atrenkami iš vadų atsitiktine tvarka. Vertinimą sudaro stebėjimai, kuriais siekiama nustatyti bendras neurologines ir elgsenos anomalijas, įskaitant fizinį vystymąsi, elgsenos ontogenezę, motorinį aktyvumą, motorinę ir jutiminę funkcijas, mokymąsi ir atmintį; jį taip pat sudaro galvos smegenų masės ir neuropatologinis vertinimas postnatalinio vystymosi ir brandos laikotarpiais.

6. Kai bandymų metodas yra taikomas kaip atskiras tyrimas, papildomai turimi kiekvienos grupės gyvūnai gali būti panaudoti konkretiems neurobiheivoristiniams, neuropatologiniams, neurocheminiams arba elektrofiziologiniams bandymams, kurių rezultatais galima papildyti duomenis, gautus atliekant pagal šį bandymų metodą rekomenduojamus tyrimus (16) (19) (20) (21). Papildomi bandymai gali būti ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai, numatomas poveikis arba veikimo mechanizmo/būdo duomenys atskleidžia, kad neurotoksiškumas yra specifinio pobūdžio. Šie papildomi bandymai gali būti taikomi ir motininėms patelėms, ir jaunikliams. Be to, dar galima atlikti *ex vivo* arba *in vitro* bandymus, jei jais nekeičiamas *in vivo* bandymų vientisumas.

PASIRENGIMAS BANDYMUI

Gyvūnų rūšies parinkimas

7. Tinkamiausia bandomųjų gyvūnų rūšis yra žiurkės; jei reikia, galima naudoti kitas gyvūnų rūšis. Tačiau reikėtų atkreipti dėmesį, kad pagal šį bandymų metodą nurodytas gestacinio ir postnatalinio laikotarpio dienų skaičius yra būdingas būtent dažniausiai naudojamų veislių žiurkėms; jeigu pasirenkama kita gyvūnų rūšis arba ne dažniausiai naudojama veislė, reikėtų atitinkamai pakoreguoti dienų skaičių. Kitos rūšies naudojimas turėtų būti pagrįstas toksikologiniais, farmakokinetikos ir (arba) kitais duomenimis. Į pagrindimą reikėtų įtraukti informaciją apie tai, ar yra atlikti tos rūšies postnatalinis neurobiheivoristinis ir neuropatologinis vertinimai. Jeigu anksčiau buvo atliktas bandymas, per kurį kilo rūpestį keliančių klausimų, reikėtų atkreipti dėmesį į rūšis/veislę, dėl kurios kilo rūpestį keliantis klausimas. Dėl skirtingų veislių žiurkėms būdingų skirtingų elgsenos savybių reikėtų surinkti įrodymus, kad pasirinktos veislės žiurkės yra pakankamai vaisingos ir pakankamai jautrios. Kitų rūšių patikimumą ir jautrumą tiriant toksinį poveikį nervų sistemos vystymuisi reikėtų pagrįsti dokumentais.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

8. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 ± 3 °C. Nors santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad ji būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis, jo seka: 12 h šviesos ir 12 h tamsos. Apšvietimo ciklą taip pat galima keisti prieš poravimąsi ir per tyrimą, siekiant įvertinti funkcinės ir elgsenos tamsoje (šviečiant raudonai šviesai), t. y. laikotarpiu, kada gyvūnai paprastai būna aktyvūs, vertinamąsias baigtis (22). Darant bet kokius šviesos ir tamsos ciklo pakeitimus, reikėtų numatyti pakankamai laiko aklimatizavimuisi, kad gyvūnai galėtų prisitaikyti prie naujo ciklo. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, o geriamojo vandens kiekis neribojamas. Pašaro ir vandens pobūdį reikėtų aprašyti, abu reikėtų ištirti, ar juose nėra teršalų.
9. Gyvūnai narveliuose gali būti laikomi atskirai arba mažomis tos pačios lyties grupėmis. Poruojama turėtų būti šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pasitvirtinus susiporavimui arba ne vėliau kaip 15 gestacijos dieną suporuoti gyvūnai turėtų būti atskiriami ir laikomi po vieną atsivedimo arba veisimo narveliuose. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio buvimo vietos. Artėjant atsivedimui, suporuotos patelės turėtų būti aprūpinamos tinkamomis ir nustatytomis gūžtos sukimo medžiagomis. Gera žinoma, kad netinkamas elgesys su gyvūnais arba stresas gestacijos metu gali turėti neigiamų padarinių, tarp jų – būti prenatalinio vados netekimo, vaisiaus arba postnatalinio vystymosi pakitimų priežastimi. Siekiant apsaugoti nuo vaisiaus praradimo dėl veiksnų, nesusijusių su bandomosios cheminės medžiagos davimu, su gyvūnais gestacijos laikotarpiu reikėtų elgtis atsargiai ir vengti išorės veiksnių, pavyzdžiui, pernelyg didelio išorės triukšmo, keliamo streso.

Gyvūnų paruošimas

10. Reikėtų naudoti sveikus dar bandymams nenaudotus ir prie laboratorijos sąlygų pripratintus gyvūnus, nebent tyrimas yra įtrauktas į kitą tyrimą (žr. 3 punktą). Bandomieji gyvūnai turėtų būti aprašomi nurodant jų rūšį, veislę, šaltinį, lytį, masę ir amžių. Kiekvienam gyvūnui reikėtų priskirti unikalų identifikavimo numerį ir kiekvieną gyvūną juo pažymėti. Kiek įmanoma, visų bandymo grupių gyvūnai turėtų būti vienodos masės ir amžiaus ir atitikti normalias tiriamos rūšies ir veislės savybes. Kiekvienu dozės lygmeniu turėtų būti naudojamos jaunos, suaugusios, palikuonių neturėjusios patelės. Reikėtų vengti vieno tėvų palikuonių poravimo ir pasirūpinti, kad taip nenutiktų. 0 gestacijos diena (GD) yra vaginalinio kamščio ir (arba) spermos atsiradimo diena. Jeigu iš tiekėjo įsigijamos jau vaikingos patelės, reikėtų joms leisti kurį laiką aklimatizuotis (pvz., 2–3 dienas). Apvaisintos patelės atsitiktinės atrankos būdu suskirstomos į kontrolinę ir bandomąją grupes ir kuo tolygiau paskirstomos po visas grupes (pvz., norint užtikrinti vienodą paskirstymą po visas grupes, rekomenduojama taikyti stratifikuotą atsitiktinę atranką, pavyzdžiui, pagal kūno masę). Grupėse turėtų būti po vienodą skaičių to paties patino apvaisintų patelių.

BANDYMO PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

11. Kiekvienoje bandymo ir kontrolinėje grupėje turėtų būti pakankamas vaikingų patelių, kurios bus veikiamos bandomąja chemine medžiaga, skaičius tam, kad būtų gauta pakankamai palikuonių neurotoksiškumui vertinti. Kiekvienu dozės lygmeniu iš viso rekomenduojama naudoti po 20 vadų. Grupėms galima taikyti kartotinio arba šachmatinio dozavimo modelį, jeigu kiekvienoje grupėje užtikrinamas reikiamas bendras vadų skaičius ir taikomi tinkami statistiniai modeliai kartotinio dozavimo rezultatams apskaičiuoti.
12. 4 postnatalinę dieną (PND) arba prieš tai (atsivedimo diena yra 0 PND) kiekvienos vados jauniklių skaičius pakoreguojamas išimant atsitiktine tvarka atrinktus perteklinius jauniklius, kad visos vados būtų vienodo dydžio (23). Vados dydis neturėtų viršyti naudojamos veislės graužikų vidutinio vados dydžio (8–12). Vadoje turėtų būti, jeigu tik tai įmanoma, po vienodą skaičių vyriškos ir moteriškos lyties jauniklių. Selektyvus jauniklių eliminavimas, pvz., pagal kūno masę, nepriimtinas. Vadas standartizavus (atlikus brokavimą) prieš atliekant tolesnį funkcinį vertinamųjų baigčių bandymą, tie konkretūs jaunikliai, kuriuos ketinama tirti prieš nujunkymą, ir tie, kuriuos ketinama tirti po nujunkymo, turėtų būti pažymėti unikalia žyma, naudojant bet kurį tinkamą humanišką jauniklių ženklavimo metodą (pvz., 24).

Gyvūnų suskirstymas funkciniam ir elgsenos bandymams, galvos smegenų masės ir neuropatologiniam įvertinimui

13. Pagal šį bandymų metodą galima taikyti įvairius būdus gyvūnams, kuriems *in utero* ir laktacijos laikotarpiu bus atliekami funkciniai ir elgsenos bandymai, vertinamas lytinis subrendimas, nustatoma galvos smegenų masė ir atliekamas neuropatologinis vertinimas, suskirstyti (25). Tam tikrais atvejais papildomai galima atlikti ir kitus neurobiheivoristinės funkcijos (pvz., socialinės elgsenos), neurocheminius arba neuropatologinius bandymus, jeigu dėl to nebus pažeistas pagrindinių reikalingų bandymų vientisumas.
14. Jaunikliai atrenkami iš kiekvienos dozės grupės ir paskirstomi vertinamosioms baigtims vertinti 4 PND arba vėliau. Jauniklius reikėtų atrinkti taip, kad per kiekvieną bandymą kiekvienos dozės grupėje iš kiekvienos vados būtų, kiek tai yra įmanoma, paimta po lygiai abiejų lyčių gyvūnų. Atliekant motorinio aktyvumo bandymą, bandymai visais amžiaus etapais iki nujunkymo atliekami su ta pačia vyriškos ir moteriškos lyties jauniklių pora (žr. 35 punktą). Atliekant visus kitus elgsenos bandymus, galima imti tas pačias arba skirtingas vyriškos ir moteriškos lyties gyvūnų poras. Atliekant nujunkytų jauniklių *versus* suaugusių gyvūnų kognityvinės funkcijos bandymus, gali tekti paskirti skirtingus jauniklius, taip siekiant išvengti rezultatų iškraipymo dėl amžiaus ir dėl išsidresavimo per ankstesnius tų rodiklių matavimus (26) (27). Pradėjus nujunkymą (21 PND) bandymams neatrinktus jauniklius galima humaniškai numarinti. Visus jauniklių suskirstymo pakeitimus reikėtų nurodyti. Statistinis mato vienetas turėtų būti vada (arba motininė patelė), ne jauniklis.
15. Tyrimams iki ir po nujunkymo, kognityviniams bandymams, patologiniams tyrimams ir t. t. jauniklius galima suskirstyti įvairiais būdais (1 pvz., parodyta bendra struktūra, 1 priedėlyje pateikti paskirstymo pavyzdžiai). Rekomenduojamas minimalus gyvūnų skaičius kiekvienos dozės grupėje atliekant tyrimus iki ir po nujunkymo yra toks:

Klinikiniai stebėjimai ir kūno masė	Visi gyvūnai
Išsamūs klinikiniai stebėjimai	Po 20 kiekvienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Galvos smegenų masė (po fiksavimo) 11–22 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)
Galvos smegenų (nefiksuotų) masė ~70 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)
Neuropatologija (panardinimas arba perfuzinė fiksacija) 11–22 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)
Neuropatologija (perfuzinė fiksacija) ~70 PND	Po 10 kiekvienos lyties (po 1 iš vados)

Lytinis subrendimas	Po 20 kiekvienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Kiti vystymosi parametrai (pasirinktinai)	Visi gyvūnai
Elgsenos ontogenezė	Po 20 vienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Motorinis aktyvumas	Po 20 vienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Motorinė ir jutiminė funkcijos	Po 20 vienos lyties (po 1 kiekvienos lyties iš vados)
Mokymasis ir atmintis	Po 10 kiekvienos lyties ^(a) (po 1 iš vados)

(a) Pagal tai, kokio jautrumo kognityvinės funkcijos bandymas yra atliekamas, reikėtų apsvastyti galimybę tirti didesnio gyvūnų skaičiaus grupę, pvz., po vieną vyriškos ir moteriškos lyties gyvūną iš kiekvienos vados (gyvūnų suskirstymas parodytas 1 priedėlyje) (daugiau informacijos apie imties dydį pateikta EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 43 (8)).

Dozavimas

16. Turėtų būti naudojamos mažiausiai trijų dydžių dozės ir lygiagrečiai naudojama viena kontrolinė grupė. Dozės turėtų būti išskirstomos intervalais taip, kad toksinis poveikis būtų laipsniškas. Jei nėra apribojimų dėl fizikinio ir cheminio cheminės medžiagos pobūdžio arba biologinių jos savybių, turi būti pasirenkama tokia didžiausia dozė, kuri sukeltų tam tikrą toksišką poveikį motininei patelei (pvz., klinikinius požymius, kūno masės augimo sumažėjimą (ne daugiau kaip 10 %) ir (arba) būtų gauta duomenų apie dozės apribojimus dėl jos toksiškumo tiksliniam organui). Didelės dozės riba pagal kūno masę gali būti 1000 mg vienam kūno masės kg per dieną su tam tikromis išimtimis. Pavyzdžiui, jei numatomas žmonių sąlytis su bandomąja chemine medžiaga, gali paaiškėti, kad reikia naudoti didesnio dydžio dozę. Taip pat reikėtų atlikti parengtinius tyrimus arba preliminarinius dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimus ir jais nustatyti, iki kokio dydžio dozė motininei patelei yra minimaliai toksiška. Jeigu atlikus standartinį toksiškumo vystymuisi tyrimą arba parengtinį tyrimą yra nustatoma, kad bandomoji cheminė medžiaga yra toksiška vystymuisi, didžiausia dozė turėtų būti maksimali dozė, kuri nesukelia pernelyg didelio toksinio poveikio palikuonims, mirties *in utero* ir ką tik gimusių jauniklių mirties arba išsigimimų, pakankamų, kad kliudytų atlikti prasmingą toksinio poveikio nervų sistemai vertinimą. Reikėtų stengtis, kad mažiausia dozė būtų tokia, kuri nesukeltų jokių toksinio poveikio motininei patelei arba vystymuisi, įskaitant nervų sistemos, požymių. Kitos dozės dydžius reikėtų pasirinkti mažėjančia tvarka taip, kad būtų pastebėtas kiekvienas su doze susijęs atsakas ir būtų nustatyta nepastebėto neigiamo poveikio riba (NOAEL) arba aptikimo ribai artimas dozės dydis, kad pagal tai būtų galima nustatyti etaloninę dozę. Nustatant dozės dydį mažėjančia tvarka, intervalas, kai dozės dydis skiriasi 2–4 kartus, dažnai būna optimalus; vietoj didelių intervalų tarp dozių (pvz., kai jų dydis skiriasi daugiau kaip 10 kartų) dažnai geriau naudoti papildomą ketvirtą bandomąją grupę.
17. Dozės dydžiai turėtų būti pasirenkami atsižvelgiant į visus turimus toksiškumo duomenis ir į papildomą informaciją apie bandomosios cheminės medžiagos arba giminingų medžiagų metabolizmo ir toksikokinetines savybes. Ši informacija taip pat gali padėti pagrįsti dozavimo režimo tinkamumą. Galimybę dozes jaunikliams duoti tiesiogiai reikėtų svarstyti atsižvelgiant į sąlyčio su bandomąja chemine medžiaga ir farmakokinetinę informaciją (28) (29). Prieš pradėdant tyrimus, per kuriuos dozės būtų duodamos tiesiogiai, reikėtų atidžiai įvertinti naudą ir trūkumus (30).
18. Lygiagrečiai tirama kontrolinė grupė turėtų būti medžiagos negaunanti kontrolinė grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Visiems gyvūnams paprastai turėtų būti duodamas vienodas, matuojant pagal kūno masę, cheminės medžiagos arba nešiklio tūris. Jei dozių ruošimui palengvinti naudojamas nešiklis arba kitas priedas, reikėtų atsižvelgti į tokias jo charakteristikas: poveikį bandomosios cheminės medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui ar sulaikymui; poveikį bandomosios cheminės medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurio gali pasikeisti jos toksiškumas; poveikį pašaro ar vandens suvartojimui arba gyvūnų imitumui. Nešiklis neturėtų kelti poveikio, kuris trukdytų aiškinti tyrimo rezultatus, neurobiheivoristinių požiūriu jis taip pat neturėtų būti toksiškas ir neturėtų veikti dauginimosi ar vystymosi. Jei nešiklis yra naujas, turėtų būti naudojama ne tik nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, bet ir nieko negaunanti kontrolinė grupė. Su kontrolinės (-ių) grupės (-ių) gyvūnais reikia elgtis lygiai taip pat, kaip ir su bandymo grupės gyvūnais.

Dozių davimas

19. Bandomoji cheminė medžiaga arba nešiklis turėtų būti duodamas tokiu būdu, kuris yra artimiausias galimo žmogaus sąlyčio su ta medžiaga būdai, remiantis turima metabolizmo ir pasiskirstymo bandomųjų gyvūnų organizme informacija. Dažniausiai duodama per virškinamąjį traktą (pvz., per zondą, kartu su pašaru, geriamuoju vandeniu), bet kiti būdai (pvz., per odą, kvėpavimo takus) taip pat gali būti taikomi atsižvelgiant į tai, kokie yra žmogaus sąlyčio su ta medžiaga ypatumai, tikėtinas arba žinomas būdas (išsamesni paaiškinimai pateikti Rekomendaciniame dokumente Nr. 43(8)). Pasirinktą davimo būdą reikėtų pagrįsti. Bandomoji cheminė medžiaga turėtų būti duodama kiekvieną dieną maždaug tuo pačiu laiku.
20. Dozė kiekvienam gyvūnui paprastai turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į patį paskutinį jo svėrimą. Tačiau reguliuojant dozės dydį paskutinį gestacijos trimestrą reikia imtis atsargumo priemonių. Jei pastebima, kad toksinis poveikis motininėms patelėms yra per didelis, jos turėtų būti humaniškai numarinamos.
21. Bandomoji cheminė medžiaga arba nešiklis suporuotoms patelėms turėtų būti duodamas ne rečiau kaip kartą per dieną nuo implantacijos dienos (6 GD) iki laktacijos laikotarpio pabaigos (21 PND), kad jaunikliai būtų bandomosios cheminės medžiagos veikiami prenatalinio ir postnatalinio nervų sistemos vystymosi laikotarpiais. Amžius, nuo kurio pradedama duoti dozes, ir dozių davimo trukmė bei dažnumas gali būti koreguojami, jeigu pagal turimus duomenis tokia bandymo struktūra yra artimesnė žmogaus patiriamam poveikiui. Dozių davimo kitų rūšių gyvūnams trukmę reikėtų pakoreguoti taip, kad būtų užtikrinta, kad gyvūnai gautų bandomosios medžiagos visais ankstyvaisiais smegenų vystymosi etapais (t. y. prenatalinį ir ankstyvąjį postnatalinį žmogaus galvos smegenų augimą atitinkančiais laikotarpiais). Doses galima pradėti duoti nuo gestacijos pradžios (0 GD), tačiau reikėtų atsižvelgti į tai, kad bandomoji cheminė medžiaga gali sukelti priešimplantacinius nuostolius. Jei dozes būtų pradedama duoti 6 GD, šios rizikos būtų išvengiama, bet tada vystymosi etapais nuo 0 iki 6 GD bandymas nevyktų. Jeigu laboratorija išsityja jau suporuotus gyvūnus, dozes duoti nuo 0 GD yra neįmanoma, taigi 6 GD būtų tinkama pradinė diena. Bandymų laboratorija turėtų nustatyti dozavimo režimą, remdamasi atitinkama informacija apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį, ankstesnę patirtį ir logistikos aspektus; be kitų dalykų ji gali pratęsti dozių davimą ir po nujunkymo. Jauniklių atsivedimo dieną gyvūnams dozių reikėtų neduoti, jei jie atsivedė dar ne visus palikuonis. Dažniausiai daroma prielaida, kad jaunikliai bus veikiami per motinos pieną; tačiau, kai neturima pakankamai įrodymų, kad jaunikliai bus veikiami nepertraukiamai, reikėtų svarstyti galimybę dozes duoti jaunikliams tiesiogiai. Nepertraukiamo veikimo įrodymų galima gauti, pvz., iš farmakokinetinės informacijos, toksiškumo palikuonims arba biologinių žymeklių pokyčių (28).

STEBĖJIMAI**Motininų patelių stebėjimas**

22. Visas motinines pateles reikėtų bent kartą per dieną apžiūrėti jų sveikatos būklei nustatyti ir patikrinti, ar jos negaišta ir ar nenugaišo.
23. Dozių davimo ir stebėjimo laikotarpiais periodiškai (bent kartą, kai dozės duodamos gestaciniu laikotarpiu, ir dukart, kai dozės duodamos laktaciniu laikotarpiu) reikėtų atlikti išsamesnius klinikinius stebėjimus, stebint bent po dešimt motininų patelių kiekvienu dozės lygmeniu. Gyvūnai turėtų būti stebimi ne narvelyje, kuriame yra laikomi, stebėjimus turi atlikti parengti techniniai darbuotojai, nežinantys apie gyvūnams duodamas dozes, naudodami standartizuotas procedūras, padedančias sumažinti stresą gyvūnams ir stebėtojo šališkumą ir kuo labiau padidinti skirtingų stebėtojų gautų rezultatų patikimumą. Jeigu įmanoma, būtų gerai, jei stebėjimus per vieną tyrimą atliktų tas pats techninis darbuotojas.
24. Pastebėjus požymių, juos reikėtų užrašyti. Jeigu įmanoma, taip pat reikėtų užrašyti stebimų požymių stiprumą. Klinikiniai stebėjimai turėtų apimti odos, kailio, akių, gleivinių, sekrecijų dažnį ir autonominių aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašaušimą, vyzdžių dydį, neįprastą kvėpavimą ir (arba) kvėpavimą per burną, visus neįprastus šlapinimosi arba tuštinimosi požymius), tačiau neapsiriboti vien tuo.
25. Taip pat turėtų būti pažymėta bet kokia neįprasta reakcija, susijusi su kūno padėtimi, aktyvumo lygiu (pvz., naudojimosi tipiniu plotu sumažėjimas arba padidėjimas) ir judesių koordinacija. Turėtų būti užrašomi eisenos (pvz., krypuojanti eisena, ataksija), laikysenos (pvz., kuprojimasis), reakcijos į elgesį su gyvūnu, vietą arba kitus aplinkos dirgiklius pakitimai, taip pat kloninių arba toninių judesių, traukulių arba drebulio buvimas, stereotipinis elgesys (pvz., besaikis valymasis, neįprasti galvos judesiai, nuolatinis sukimasis ratu), keistas elgesys (pvz., kandžiojimas arba per didelis laišymasis, žalojimas, vaikščiojimas atbulomis, vokalizacija) arba agresija.

26. Toksinio poveikio požymius, įskaitant jų atsiradimo pradžią, paros metą, laipsnį ir trukmę, reikėtų užrašyti.
27. Gyvūnus reikėtų sverti, kai jiems duodamos dozės, per visą tyrimą: bent kartą per savaitę, jauniklių atsivedimo arba artimą jam dieną ir 21 PND (nujunkymo dieną). Jeigu tyrime naudojamas zondas, motininės patelės turėtų būti sveriamos bent dukart per savaitę. Prireikus po kiekvieno kūno masės matavimo dozes reikėtų koreguoti. Pašaro suvartojimą gestacijos ir laktacijos laikotarpiais reikėtų matuoti bent kartą per savaitę. Vandens suvartojimą reikėtų matuoti bent kartą per savaitę, jeigu gyvūnas yra veikiamas per vandenį.

Palikuonių stebėjimas

28. Visus palikuonis reikėtų bent kartą per dieną atidžiai apžiūrėti, ar nepasireiškia toksinio poveikio požymiai, ar jie negaišta ir ar nenugaišo.
29. Dozių davimo ir stebėjimo laikotarpiais reikėtų atlikti išsamesnius palikuonių klinikinius tyrimus. Palikuonius (bent po vieną kiekvienos lyties jauniklį iš vados) turėtų stebėti parengti techniniai darbuotojai, nežinantys apie gyvūnams duodamas dozes, naudodami standartizuotas procedūras, padedančias sumažinti šališkumą ir kuo labiau padidinti skirtingų stebėtojų gautų rezultatų patikimumą. Jeigu įmanoma, būtų gerai, jei stebėjimus atliktų tas pats techninis darbuotojas. Reikėtų stebėti bent 24 ir 25 punktuose aptartas stebimu vystymosi laikotarpiu aktualias vertinamąsias baigtis.
30. Visus toksinio poveikio palikuonims požymius, įskaitant jų atsiradimo pradžią, paros metą, laipsnį ir trukmę, reikėtų užrašyti.

Fiziniai ir vystymosi parametrai

31. Vystymosi parametrų iki nujunkymo pokyčiai (pvz., ausies kaušelio išsilyginimas, akių atsivėrimas, kandžių prasišalimas) yra glaudžiai susiję su kūno mase (30) (31). Kūno masė gali būti geriausias fizinio vystymosi rodiklis. Todėl atlikti vystymosi parametrų matavimus yra rekomenduojama tik tada, kai turima įrodymų, kad iš šių vertinamųjų baigčių bus gauta papildomos informacijos. Šių parametrų vertinimo laikas nurodytas 1 lentelėje. Pagal tai, kokio poveikio tikimasi, ir tai, kokie yra pradiniai matavimo rezultatai, gali būti tikslinga numatyti papildomus laiko momentus arba matavimus atlikti kitais vystymosi etapais.
32. Vertinant fizinį vystymąsi, rekomenduotina tyrimą atlikti postkoitaliniu, o ne postnatalinio amžiaus etapu (33). Jeigu bandymai su jaunikliais atliekami nujunkymo dieną, šiuos bandymus rekomenduojama atlikti iki faktinio nujunkymo, kad dėl patiriamo su nujunkymu susijusio streso rezultatai nebūtų iškreipiami. Be to, dvi dienas po nujunkymo nereikėtų atlikti jokių jauniklių bandymų, atliktinų po nujunkymo.

1 lentelė

Fizinių ir vystymosi parametrų bei funkcinių/elgsenos vertinamųjų baigčių vertinimo laikas ^(a)

Amžiaus tarpsniai	Iki nujunkymo ^(b)	Paaugę jaunikliai ^(b)	Jauni suaugę gyvūnai ^(b)
Vertinamosios baigtys			
Fiziniai ir vystymosi parametrai			
Kūno masė ir klinikiniai stebėjimai	Kas savaitę ^(c)	Ne rečiau kaip kas dvi savaites	Ne rečiau kaip kas dvi savaites
Galvos smegenų masė	22 PND ^(d)		Bandymo pabaigoje
Neuropatologija	22 PND ^(d)		Bandymo pabaigoje
Lytinis subrendimas	—	Pagal poreikį	—
Kiti vystymosi parametrai ^(e)	Pagal poreikį	—	—

Amžiaus tarpsniai	Iki nujunkymo ^(b)	Paaugę jaunikliai ^(b)	Jauni suaugę gyvūnai ^(b)
-------------------	------------------------------	----------------------------------	-------------------------------------

Funkcinės/elgsenos vertinamosios baigtys

Elgsenos ontogenezę	Ne mažiau kaip du matavimai		
Motorinis aktyvumas (įskaitant įpročių formavimąsi)	1–3 kartus ^(f)	—	Vieną kartą
Motorinė ir jutiminė funkcijos	—	Vieną kartą	Vieną kartą
Mokymasis ir atmintis	—	Vieną kartą	Vieną kartą

(a) Šioje lentelėje nurodoma, kiek mažiausiai kartų reikėtų atlikti matavimus. Pagal tai, kokio poveikio tikimasi, ir tai, kokie yra pradiniai matavimo rezultatai, gali būti tikslinga numatyti papildomus laiko momentus (pvz., senesni gyvūnai) arba matavimus atlikti kitais vystymosi etapais.

(b) Bandymų su jaunikliais rekomenduojama neatlikti dvi dienas po nujunkymo (žr. 32 punktą). Rekomenduojamas bandymų su paaugusiais jaunikliais amžius: mokymasis ir atmintis = 25 ± 2 PND; motorinė ir jutiminė funkcijos = 25 ± 2 PND. Rekomenduojamas bandymų su jaunais suaugusiais gyvūnais amžius yra 60–70 PND.

(c) Kūno masę reikėtų matuoti bent du kartus per savaitę, kai dozės jaunikliams duodamos tiesiogiai, kad tuo atveju, jeigu kūno masė sparčiai auga, dozės būtų galima pakoreguoti.

(d) Galvos smegenų masę ir neuropatologiją, jei reikia, galima vertinti kuriuo nors ankstesniu etapu (pvz., 11 PND) (žr. 39 punktą).

(e) Kiti vystymosi parametrai, ne tik kūno masė (pvz., akių atsivėrimas) taip pat turėtų būti pririnkus užrašomi (žr. 31 punktą).

(f) Žr. 35 punktą.

33. Reikėtų suskaičiuoti gyvus jauniklius ir nustatyti jų lytį, pvz., vizualiai įvertinti arba išmatuoti anogenitalinį atstumą (34) (35), kiekvieną vados jauniklių reikėtų atskirai pasverti vos atsivestą ar netrukus po atsivėdimo, bent kartą per savaitę laktacijos laikotarpiu, o vėliau – bent kartą per dvi savaites. Vertinant lytinę subrendimą, reikėtų nustatyti bent vieno kiekvienos vados patinėlio ir vienos patelės amžių ir kūno masę, kada susiformuoja makštis (35) arba atsiskiria apyvarpė (37).

Elgsenos ontogenezę

34. Tiriant pasirinktų elgsenos rodiklių ontogenezę, bent po vieną kiekvienos lyties jauniklį iš vados reikėtų vertinti atitinkamu amžiaus laikotarpiu, visas bandymo dienas visiems elgsenos rodikliams vertinti naudojant tuos pačius jauniklius. Matavimo dienos turėtų būti tolygiai paskirstytos per tą laikotarpį; turėtų būti aprašomi įprasti arba su dozės davimu susiję tos elgsenos ontogenežės pokyčiai (38). Štai keletas elgsenos rodiklių, kurių ontogenezę būtų galima vertinti, pavyzdžiui: išsitiesimo refleksas, neigiamas geotaksis (angl. negative geotaxis), motorinis aktyvumas (38) (39) (40).

Motorinis aktyvumas

35. Motorinį aktyvumą reikėtų stebėti (41) (42) (43) (44) (45) laikotarpiu iki nujunkymo ir gyvūnui suaugus. Dėl bandymų nujunkymo laikotarpiu žr. 32 punktą. Bandymo sesija turėtų trukti pakankamai ilgai, kad būtų galima matyti, jog dozių negaunantys kontrolinės grupės gyvūnai priprato prie bandymo sesijos sąlygų. Motorinį aktyvumą itin rekomenduojama naudoti elgsenos ontogenezei vertinti. Kai jis naudojamas kaip elgsenos ontogenežės kriterijus, visose bandymo iki nujunkymo sesijose reikėtų naudoti tuos pačius gyvūnus. Bandymas turėtų būti atliekamas pakankamai dažnai, kad būtų galima įvertinti pripratimo prie sesijos sąlygų ontogenezę (44). Tam iki nujunkymo dienos įskaitytinai gali prireikti įvertinti tris arba daugiau laikotarpių (pvz., 13, 17, 21 PND). Bandymus su tais pačiais arba tos pačios vados gyvūnais dar reikėtų atlikti gyvūnams suaugus, artėjant tyrimo pabaigai (pvz., 60–70 PND). Bandymus kitomis dienomis galima atlikti papildomai pagal poreikį. Motoriniam aktyvumui stebėti reikėtų naudoti automatizuotą aktyvumo fiksavimo prietaisą, kuriuo būtų galima nustatyti aktyvumo didėjimą ir mažėjimą (t. y. pradinę prietaisu išmatuoto aktyvumo reikšmę neturėtų būti nei tokia maža, kad nebūtų galima nustatyti jo sumažėjimo, nei tokia didelė, kad nebūtų galima nustatyti aktyvumo padidėjimo). Kiekvieną prietaisą reikėtų patikrinti pagal standartines procedūras, siekiant, kiek įmanoma, užtikrinti patikimą

skirtingų prietaisų veikimą visomis dienomis. Prietaisus bandomosioms grupėms reikėtų paskirstyti kuo proporcingiau. Bandymą reikėtų atlikti atskirai su kiekvienu gyvūnu. Bandymų laiką bandomosioms grupėms reikėtų proporcingai paskirstyti, kad būtų išvengta rezultatų iškraipymo dėl cirkadinio aktyvumo ritmo. Reikėtų stengtis užtikrinti, kad bandymo sąlygos kuo mažiau skirtųsi ir nebūtų sistemiskai susietos su dozių davimu. Tarp kintamųjų, kurie gali paveikti daugelį elgsenos matų, įskaitant motorinį aktyvumą, yra: bandymo narvelio triukšmo izoliacija, dydis ir forma, temperatūra, santykinė drėgmė, apšvietimo sąlygos, kvapai, narvelio, kuriame gyvūnas laikomas nuolat, arba naujo bandymų narvelio naudojimas ir aplinkos dirgikliai.

Motorinė ir jutiminė funkcijos

36. Motorinę ir jutiminę funkcijas reikėtų nuodugniai ištirti bent vieną kartą per paaugusio jauniklio amžiaus laikotarpį ir vieną kartą per jauno suaugusio gyvūno amžiaus laikotarpį (pvz., 60–70 PND). Dėl bandymų nujunkymo laikotarpiu žr. 32 punktą. Bandymų reikėtų atlikti pakankamai – tiek, kad būtų gautas reikiamas skaičius kiekybinių jutiminio modalumo (pvz., somatosensorinio, vestibuliarinio) ir motorinių funkcijų (pvz., jėgos, koordinacijos) pavyzdžių. Keletas motorinės ir jutiminės funkcijų pavyzdžių: ekstensoriaus ištiesimo reakcija (46), ištiesimo refleksas (47) (48), pripratimas prie garsinio dirgiklio (40) (49) (50) (51) (52) (53) (54), sukeltas potencialas (55).

Mokymosi ir atminties bandymai

37. Asociatyvaus mokymosi ir atminties bandymą reikėtų atlikti po nujunkymo (pvz., 25 ± 2 dieną) ir tam naudoti jaunus suaugusius gyvūnus (60 PND amžiaus ir vyresnius). Dėl bandymų nujunkymo laikotarpiu žr. 32 punktą. Šiais dviem vystymosi etapais galima atlikti tą patį arba kitą (-us) bandymą (-us). Pasirenkant bandymą (-us) nujunkytų ir suaugusių žiurkių mokymuisi ir atminčiai tirti, leidžiamas tam tikras lankstumas. Tačiau bandymas (-ai) turėtų būti parengtas (-i) taip, kad atitiktų du kriterijus. Pirma, mokymasis turėtų būti vertinamas kaip pokytis, kuris įvyksta per keletą kartojamų bandymų arba sesijų arba, kai bandymas yra vienas, kaip būsenos pokytis dėl neasociatyvaus mokymosi patirties poveikio. Antra, per bandymą (-us) reikėtų tirti ne tik pradinį mokymąsi (igūdžių igijimą), bet ir tam tikrą atminties matą (trumpalaikę arba ilgalaikę atmintį), tačiau šio atminties mato negalima aprašyti tol, kol per tą patį bandymą nebus įvertintas igūdžių igijimas. Jeigu mokymosi ir atminties bandymas (-ai) atskleidžia bandomosios cheminės medžiagos poveikį, galima apsvarstyti galimybę atlikti papildomą (-us) bandymą (-us), kad remiantis jutiminių, motyvacijos ir (arba) motorinių gebėjimų pokyčiais būtų galima atmesti alternatyvius aiškinimus. Mokymosi ir atminties bandymų metodą, be paminėtų dviejų kriterijų, dar rekomenduojama pasirinkti pagal jo jautrumą tiriamosios cheminės medžiagos klasės medžiagoms, jeigu literatūroje esama tokios informacijos. Jeigu tokios informacijos nėra, tai bandymai, kuriuos būtų galima atlikti laikantis nurodytųjų kriterijų, pavyzdžiui, yra šie: pasyvaus vengimo (angl. *passive avoidance*) (43) (56) (57), gebėjimo prisiminti tam tikrą padėtį po pertraukos (angl. *delayed-matching-to-position*), kai tiriamos suaugusios žiurkės (58) ir žiurkių jaunikliai (59), poveikio per uoslę (angl. *olfactory conditioning*) (43) (60), Morris vandens labirinto (angl. *Morris water maze*) (61) (62) (63), Biel arba Sinsinacio labirinto (angl. *Biel or Cincinnati maze*) (64) (65), radialinių atšakų labirinto (angl. *radial arm maze*) (66), T labirinto (angl. *T-maze*) (43), nuo režimo priklausančios elgsenos susiformavimo ir išlikimo (angl. *acquisition and retention of schedule-controlled behaviour*) (26) (67) (68). Literatūroje aptariami ir kiti bandymai, skirti nujunkytoms (26) (27) ir suaugusioms žiurkėms (19) (20).

Nekroskopija

38. Po palikuonių nujunkymo galima atlikti motininių gyvūnų eutanaziją.
39. Neuropatologinis palikuonių vertinimas bus atliekamas naudojant 22 PND arba anksčiau, 11–22 PND, ir tyrimo pabaigoje humaniškai numarintų gyvūnų audinius. Tiriant 22 PND numarintus palikuonis, reikėtų vertinti jų galvos smegenų audinius; tiriant tyrimo pabaigoje numarintus gyvūnus – ir centrinės nervų sistemos (CNS), ir periferinės nervų sistemos (PNS) audinius. 22 PND arba anksčiau numarinti gyvūnai gali būti fiksuojami panardinant į fiksatyvą arba perfuzinės fiksacijos būdu. Tyrimo pabaigoje numarinti gyvūnai turėtų būti fiksuojami perfuzinės fiksacijos būdu. Visi audinių mėginių paruošimo aspektai nuo gyvūnų perfuzijos iki audinių mėginių išplovimo, audinių paruošimo ir objektinių stiklelių dažymo turėtų būti tarpusavyje taip suderinti, kad kiekvienoje partijoje būtų reprezentatyvių mėginių iš kiekvienos dozės grupės. Išsamesnės neuropatologinių tyrimų gairės išdėstytos EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 20 (9), taip pat žr. (103).

Audinių mėginių paruošimas

40. Visas pagrindines per nekroskopiją pastebėtas anomalijas reikėtų registruoti. Paimti audinių mėginiai turėtų atspindėti visas pagrindines nervų sistemos sritis. Audinių mėginius reikėtų laikyti tinkamame fiksatyve ir tirti pagal standartizuotus paskelbtus histologinių tyrimų protokolus (69) (70) (71) (103). CNS ir PNS audinius galima įterpti į parafiną, tačiau kai reikalinga didesnė rezoliucija (pvz., tiriant periferinius nervus, kai įtariama periferinė neuropatija ir (arba) kai atliekama morfometrinių periferinių nervų analizė), po fiksavimo gali būti tikslinga naudoti osmį ir įterpti į epoksidinę dervą. Morfometrinei analizei atlikti visais dozės lygmenimis paimti galvos smegenų audiniai

turėtų būti įterpti į tinkamą terpę tuo pačiu metu, siekiant išvengti artefaktų susitraukimo dėl pernelyg ilgo laikymo fiksytyve (6).

Neuropatologinis tyrimas

41. Šio kokybinio tyrimo paskirtis:

- i) nustatyti nervų sistemos sritis, kuriose yra neuropatologinių pokyčių požymių;
- ii) nustatyti neuropatologinių pokyčių, kurie atsirado dėl veikimo bandomąja chemine medžiaga, pobūdį; ir
- iii) nustatyti neuropatologinių pokyčių sunkumo intervalą.

Reprezentatyvius histologiniam tyrimui skirtus audinių mėginių mikroskopu turėtų ištirti tinkamai parengtas patologas, kuris nustatytų, ar esama neuropatologinių pokyčių požymių. Visus neuropatologinius pokyčius reikėtų įvertinti subjektyviu balu, žyminčiu pokyčio dydį. 22 PND arba anksčiau humaniškai numarintų gyvūnų galvos smegenų dalims įvertinti gali pakakti hematoksilino ir eozino dažų. Tačiau tyrimo pabaigoje numarintų gyvūnų CNS ir PNS audinių dalims tirti rekomenduojama naudoti mielino dažus (pvz., *luxol fast blue/cresyl violet*) ir sidabravimo dažus (pvz., *Bielschowsky* arba *Bodian*). Remiantis profesionalia patologo nuomone ir pagal tai, kokio pobūdžio pakitimų pastebėta, galima apsvarstyti galimybę naudoti kitus dažus, skirtus konkreitiems pakitimams nustatyti ir apibūdinti (pvz., glialinio fibrilinės rūgšties baltymo (GFAP) arba lektino histocheminį dažymą glialiniams ir mikroglijaliniams pokyčiams įvertinti (72), *Fluoro-Jade* dažus nekrozei nustatyti (73) (74) arba sidabravimo dažus, skirtus neuronų degeneracijai nustatyti (75)).

42. Reikėtų atlikti morfometrinių (kiekybinių) vertinimą, nes jo duomenys gali padėti nustatyti su dozės davimu susijusį poveikį ir yra vertingi aiškinant su dozės davimu susijusius galvos smegenų masės arba morfologijos skirtumus (76) (77). Kad būtų galima atlikti morfometrinių vertinimą, reikėtų paimiti ir paruošti nervų audinio mėginį. Morfometrinių vertinimą gali sudaryti, pvz., konkrečių smegenų sričių tiesiniai arba zoniniai matavimai (78). Tiesiniams arba zoniniams matavimams atlikti reikia naudoti homologiškus kruopščiai pagal patikimus mikroskopinius parametrus pasirinktus pjūvius (6). Stereologiją galima naudoti, kai norima nustatyti su dozės davimu susijusį poveikį tokiems parametrams kaip konkrečių neuroanatominių sričių dydis ar ląstelių skaičius (79) (80) (81) (82) (83) (84).
43. Smegenis reikėtų ištirti, ar nėra su dozės davimu susijusių neuropatologinių pokyčių; norint užtikrinti, kad tyrimas būtų nuodugnus, iš visų svarbiausių smegenų sričių (pvz., uoslės svogūnėlių, smegenų žievės, hipokampo, bazalinių ganglijų, gumburo, pogumburio, vidurinių smegenų (keturkalnio, smegenų dangčio ir smegenų kojųčių), tilto, pailgųjų smegenų, smegenėlių) reikėtų paimiti pakankamai mėginių. Svarbu, kad tiriant visus gyvūnus būtų imami tos pačios plokštumos pjūviai. Iš tyrimo pabaigoje humaniškai numarintų gyvūnų reikėtų paimiti reprezentatyvius nugaros smegenų ir PNS pavyzdžius. Tarp tiriamų sričių turėtų būti akis su regos nervu ir tinklaine, nugaros smegenys kaklo ir juosmens sutorėjimų vietose, užpakalinės ir priekinės nugaros smegenų šaknelės pluoštai, proksimalinis sėdmens nervas, proksimalinis blauzdkaulio nervas (prie kelio) ir blauzdkaulio nervo šakos į blauzdos raumenį. Nugaros smegenų ir periferinės nervų sistemos pjūviai turėtų būti ir kryžminiai arba skersiniai, ir išilginiai.
44. Atliekant neuropatologinį vertinimą reikėtų tirti ne tik ląstelių pokyčius (pvz., neuronų vakuolizaciją, degeneraciją, nekrozę) ir audinių pokyčius (pvz., gliozę, leukocitinę infiltraciją, cistų susiformavimą), bet ir tai, ar nėra nervų sistemos vystymosi pažeidimų požymių (6) (85) (86) (87) (88) (89). Šiuo požiūriu svarbu, kad su dozės davimu susijęs poveikis būtų atskirtas nuo normalaus vystymosi požymių, kurie atsiranda numaravimo laiką atitinkančiame vystymosi etape (90). Reikšmingų pokyčių, rodančių vystymosi sutrikimus, pavyzdžiai (sąrašas nėra baigtinis):

- uoslės svogūnėlių, didžiųjų galvos smegenų arba smegenėlių bendro dydžio arba formos pokyčiai;
- įvairių galvos smegenų sričių (pvz., smegenėlių išorinio užuomazginio sluoksnio, didžiosios smegenų jungties) santykinio dydžio pokyčiai, įskaitant jų sumažėjimą arba padidėjimą dėl ląstelių populiacijų, kurios paprastai būna kintančios, mažėjimo ir ilgesnio nei įprastai gyvavimo, taip pat dėl aksonų projekcijų;
- proliferacijos, migracijos ir diferenciacijos pokyčiai, kuriuos atspindi pernelyg didelės apoptozės arba nekrozės plotai, ektopinių, sutrikdytos orientacijos arba pakitusios sandaros neuronų populiacijų grupės arba išsklaidytos populiacijos, santykinio įvairių žievės sluoksnių struktūrų dydžio pokyčiai;

- mielino kaupimosi pokyčiai, įskaitant bendrą struktūrą, kuriose kaupiasi mielinai, dydžio sumažėjimą arba pokyčius;
- hidrocefalijos požymiai, ypač skilvelių padidėjimas, smegenų vandentiekio stenoze ir smegenų pusrutulių suplonėjimas.

Dozės ir atsako tarpusavio ryšys neuropatologinių pokyčių atveju

45. Kokybinei ir kiekybinei neuropatologinei analizei atlikti rekomenduojama taikyti toliau aptartą nuoseklųjį metodą. Iš pradžių lyginami didelės dozės ir kontrolinės grupės gyvūnų audinių dalys. Jeigu didelės dozės grupės gyvūnams neuropatologinių pakitimų nenustatoma, toliau analizuoti nereikia. Jeigu didelės dozės gyvūnų grupėje nustatomi neuropatologiniai pokyčiai, tada tiriami vidutinės ir mažos dozės grupių gyvūnai. Jeigu didelės dozės grupė nebetiriama dėl nugaišimo arba kito rezultatus iškreipiančio toksiškumo, reikėtų tirti, ar neuropatologinių pokyčių nėra didelės ir vidutinės dozės grupėse. Jeigu mažesnių dozių grupėse pastebima toksinio poveikio nervų sistemai požymių, atliekama šių grupių gyvūnų neuropatologinė analizė. Jeigu atliekant kokybinius arba kiekybinius tyrimus yra nustatomi su dozės davimu susiję neuropatologiniai pokyčiai, reikėtų, remiantis visų dozių grupių gyvūnų vertinimu, nustatyti pažeidimų arba morfometrinių pokyčių pasireiškimo, dažnumo ir laipsnio priklausomybę nuo dozės. Per šį vertinimą reikėtų vertinti visas galvos smegenų sritis, kuriose pastebėta neuropatologinių pokyčių požymių. Apibūdinant kiekvieno pobūdžio pažeidimą reikėtų apibrėžti kriterijus, pagal kuriuos yra nustatomas kiekvienas pažeidimo laipsnis, ir nurodyti požymius, pagal kuriuos kiekvienas laipsnis yra atskiriamas. Kiekvieno pobūdžio pažeidimo dažnumą ir sunkumo laipsnį reikėtų užrašyti, paskui atlikti statistinę analizę ir įvertinti dozės ir atsako tarpusavio ryšio pobūdį. Rekomenduojama naudoti koduotus objektinius stiklius (91).

DUOMENYS IR ATASKAITA

Duomenys

46. Duomenys pateikiami atskirai ir apibendrinami lentelėse, nurodant kiekvienos bandymo grupės pakitimų pobūdį, motininių patelių skaičių, palikuonių skaičių pagal lytis ir vadas, kuriose atsirado kiekvienos rūšies pakitimų. Jeigu palikuonys buvo tiesiogiai veikiami postnataliniu laikotarpiu, reikėtų nurodyti veikimo būdą, trukmę ir laikotarpį.

Rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

47. Neurotoksiškumo vystymuisi tyrimas suteiks informacijos apie kartotinio sąlyčio su chemine medžiaga poveikį *in utero* ir ankstyvuojų postnatalinio vystymosi laikotarpiu. Kadangi akcentuojamos ir bendrojo toksiškumo, ir toksiškumo vystymuisi vertinamosios baigtys, tyrimo rezultatai leis atskirti poveikį nervų sistemos vystymuisi, kai nėra bendrojo motininės patelės toksiškumo, ir poveikį, kuris sukeliamas tik esant koncentracijai, kuri toksiška ir motininiam gyvūnui (27). Kadangi tyrimo struktūra, statistinė analizė ir biologinis duomenų reikšmingumas yra susiję sudėtingais ryšiais, norint tinkamai interpretuoti neurotoksiškumo vystymuisi duomenis, reikės remtis ekspertų vertinimu (107) (109). Bandymo rezultatams aiškinti reikėtų taikyti įrodomosios vertės analizę (20) (92) (93) (94). Reikėtų aptarti elgsenos arba morfologinių duomenų, jei tokių gauta, modelius, taip pat duomenis apie dozės ir atsako ryšį. Į šį apibūdinimą reikėtų įtraukti duomenis visų tų tyrimų, kurie būtų svarbūs vertinant neurotoksiškumą vystymuisi, įskaitant žmonių epidemiologinius tyrimus arba konkrečių atvejų ataskaitas, tyrimus su bandomaisiais gyvūnais (pvz., toksikokinetinius duomenis, informaciją apie struktūrą ir aktyvumą, kitų toksiškumo tyrimų duomenis). Taip pat reikėtų įtraukti duomenis apie bandomosios cheminės medžiagos dozės ir neurotoksiškumo kiekvienos lyties gyvūnams tarpusavio ryšio buvimą arba nebuvimą, dažnumą ir mastą (20) (95).
48. Vertinant duomenis reikėtų aptarti ir biologinį, ir statistinį reikšmingumą. Į statistinę analizę reikėtų įvesti kaip į priemonę, kuri duomenis padeda aiškinti, o ne nulemia jų aiškinimą. Tai, kad statistinio reikšmingumo nepakanka, negali būti vienintelis kriterijus padaryti išvada, kad su dozių davimu susijusio poveikio nėra, kaip ir statistinio reikšmingumo buvimas neturėtų būti vienintelis kriterijus padaryti išvada, kad su dozių davimu susijusio poveikio esama. Siekiant išvengti galimų klaidingų neigiamų išvadų ir sunkumų, kurių kyla, kai reikia įrodyti nesamą dalyką, reikėtų aptarti turimus teigiamus ir ankstesnius kontrolinius duomenis, ypač tais atvejais, kai su dozių davimu susijusio poveikio nėra (102) (106). Klaidingų teigiamų duomenų tikimybę reikėtų aptarti atsižvelgiant į bendrą statistinį duomenų įvertinimą (96). Be kitų dalykų, taip pat reikėtų įvertinti neuropatologinių ir elgsenos pakitimų tarpusavio ryšį, jei jis pastebėtas.

49. Visus rezultatus reikėtų analizuoti naudojant pagal bandymo struktūrą tinkamus statistinius modelius (108). Parametrinės arba neparametrinės analizės metodus reikėtų rinktis atsižvelgiant į tokius veiksnius kaip duomenų pobūdis (transformuoti ar ne), jų pasiskirstymas, santykinis pasirinktos statistinės analizės patikimumas. Statistinę analizę reikėtų pasirinkti pagal tyrimo tikslą ir struktūrą, siekiant minimizuoti I tipo (klaidingi teigiami rezultatai) ir II tipo (klaidingi neigiami rezultatai) klaidų kiekį (96) (97) (104) (105). Kai vystymosi tyrimams yra naudojamos po keletą palikuonių vienu metu atsivedančių gyvūnų rūšys ir tiriama po keletą vienos vados jauniklių, į statistinį modelį reikėtų įtraukti ir vadą ir taip apsisaugoti nuo pernelyg didelių I tipo klaidų (98) (99) (100) (101). Statistinis mato vienetas turėtų būti vada, ne jauniklis. Bandymus reikėtų suplanuoti taip, kad tos pačios vados gyvūnai nebūtų laikomi nepriklausomais stebėjimo objektais. Visos pakartotinai vertinamos to paties subjekto vertinamosios baigtys turėtų būti analizuojamos taikant tokius statistinius modelius, kuriuose atsižvelgiama į tai, kad šie matai nėra savarankiški.

Bandymo ataskaita

50. Bandymo ataskaitoje turėtų būti pateikta ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- fizikinė būseną ir, jei reikia, fizikinės ir cheminės savybės;
- tapatumo duomenys, įskaitant šaltinį;
- preparato grynumas ir žinomos ir (arba) numanomos priemonės.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei tai ne vanduo ir ne fiziologinis tirpalas.

Bandomieji gyvūnai:

- naudojamos rūšys ir veislės ir pagrindimas, jei pasirinktos ne žiurkės;
- bandomųjų gyvūnų tiekėjas;
- gyvūnų skaičius, amžius bandymo pradžioje ir lytis;
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras, vanduo ir t. t.;
- kiekvieno gyvūno masė bandymo pradžioje.

Bandymo sąlygos:

- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;
- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės davimo būdo ir laikotarpio pasirinkimą;
- duodamos dozės specifikacija, įskaitant išsamią informaciją apie nešiklį, duodamos medžiagos tūrį ir fizikinį pavidalą;
- duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą ir (arba) jos dėjimą į pašarą, gautą preparato koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;
- metodas, taikytas motininėms patelėms ir jaunikliams paženklininti unikalios žyma;
- atsitiktinės atrankos, taikytos motininėms patelėms suskirstyti į dozes gaunančias grupes, jaunikliams brokuoti ir suskirstyti į bandymo grupes, išsamus aprašas;
- informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašaruose, geriamajame vandenyje arba įkvepiamos bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei reikia;
- aplinkos sąlygos;
- duomenys apie pašaro ir vandens (pvz., vandentiekio, distiliuotas) kokybę;
- tyrimo pradžios ir pabaigos datos.

Stebėjimo ir bandymo procedūros:

- išsamus stebėjimų ir procedūrų standartizavimo aprašas ir naudotos apibrėžtys stebėjimų rezultatams įvertinti balais;
- taikytų bandymo procedūrų sąrašas ir jų taikymo pagrindimas;
- duomenys apie taikytas elgsenos/funkcinių, patologinių, neurocheminių arba elektropsichologinių bandymų procedūras, taip pat informacija ir išsamūs duomenys apie automatizuotus prietaisus;
- prietaisų kalibravimo procedūros ir procedūros, skirtos užtikrinti, kad prietaisų parodymai būtų lygiaverčiai ir kad bandymai su dozės gaunančiomis grupėmis būtų atliekami proporcingai;
- glaustas pagrindimas paaiškinant sprendimus, kuriuos priimant remtasi profesionaliu vertinimu.

Rezultatai (pavieniai ir suvestiniai, jei reikia, nurodant vidurkį ir dispersiją):

- gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje ir tyrimo pabaigoje;
- gyvūnų ir vadų skaičius, naudotas bandymui pagal kiekvieną metodą;
- kiekvieno gyvūno ir vados, iš kurios jis kilęs, identifikavimo numeris;
- vados dydis ir vidutinė atsivestų jauniklių masė pagal lytį;
- kūno masė ir duomenys apie kūno masės pokyčius, įskaitant motininių patelių ir jauniklių kūno masę numarinimo etapu;
- duomenys apie pašaro ir vandens, jei reikia (pvz., jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra duodama su vandeniu), suvartojimą;
- duomenys apie toksinį atsaką pagal lytį ir dozės dydį, taip pat apie toksiškumo požymius arba nugaišusius gyvūnus, įskaitant, jei reikia, nugaišimo laiką ir priežastį;
- išsamių pastebėtų klinikinių požymių tipas, sunkumas, trukmė, pradžios data, paros laikas, tolesnė eiga;
- kiekvieno vystymosi parametro (masės, lytinio subrendimo ir elgsenos ontogenezės) balas kiekvienu stebėjimo momentu;
- išsamus nustatytų elgsenos, funkcinių, neuropatologinių, neurocheminių, elektropsichologinių požymių aprašas pagal lytį, įskaitant padidėjimą ir sumažėjimą dėl kontrolės;
- nekroskopijos duomenys;
- smegenų masė;
- visos diagnozės pagal neurologinius požymius ir pažeidimus, įskaitant natūraliai atsirandančias ligas arba būsenas;
- požymių pavyzdžių nuotraukos;
- mažo padidėjimo mikroskopinės nuotraukos morfometrijai naudotų pjūvių homologijai įvertinti;
- absorbcijos ir metabolizmo duomenys, taip pat papildomi duomenys iš atskirų toksikokinetinių tyrimų, jei turimi;
- statistinis rezultatų apdorojimas, įskaitant duomenims ir rezultatams, nepaisant to, ar jie buvo reikšmingi, ar ne, analizuoti taikytus statistinius modelius;
- tyrimo grupės narių sąrašas, įskaitant profesinį parengimą.

Rezultatų aptarimas:

- informacija apie dozės ir atsako santykį pagal lytį ir grupę;
- tai, kiek visas kitas toksinis poveikis turėjo įtakos išvadam dėl bandomosios cheminės medžiagos galimo neurotoksiškumo, pagal lytį ir grupę;

- tai, kiek toksikokinetiniai duomenys turėjo įtakos išvadai;
- panašumas į kitų žinomų neurotoksiškų medžiagų poveikį;
- duomenys, kuriais pagrindžiamas bandymų metodo patikimumas ir jautrumas (t. y. teigiami ir ankstesni kontroliniai duomenys);
- neuropatologinio ir funkcinio poveikio ryšys, jei yra;
- NOAEL arba etaloninė dozė motininėms patelėms ir jaunikliams pagal lytį ir grupę.

Išvados:

- bendras duomenų aiškinimas remiantis rezultatais, įskaitant išvadą, ar bandomoji cheminė medžiaga sukėlė neurotoksinį poveikį vystymuisi, ir NOAEL.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- (1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 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. Paskelbta: [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. Paskelbta: [<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., US, 23–25 October 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, July 2008. Paskelbta: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](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. Paskelbta: [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 neuro-developmental 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) Šio priedo B.34 skyrius „Toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas“.
- (15) Šio priedo B.35 skyrius „Toksiškumo dviejų kartų dauginimuisi bandymas“.
- (16) Šio priedo B.43 skyrius „Neurotoksiškumo graužikams bandymas“.
- (17) Šio priedo B.31 skyrius „Toksiškumo prenataliniam vystymuisi bandymas“.
- (18) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. OL L 276, 2010 10 20, p. 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. Paskelbta: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Paskelbta: [<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 Pharmaceuticals 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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. pp. 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.

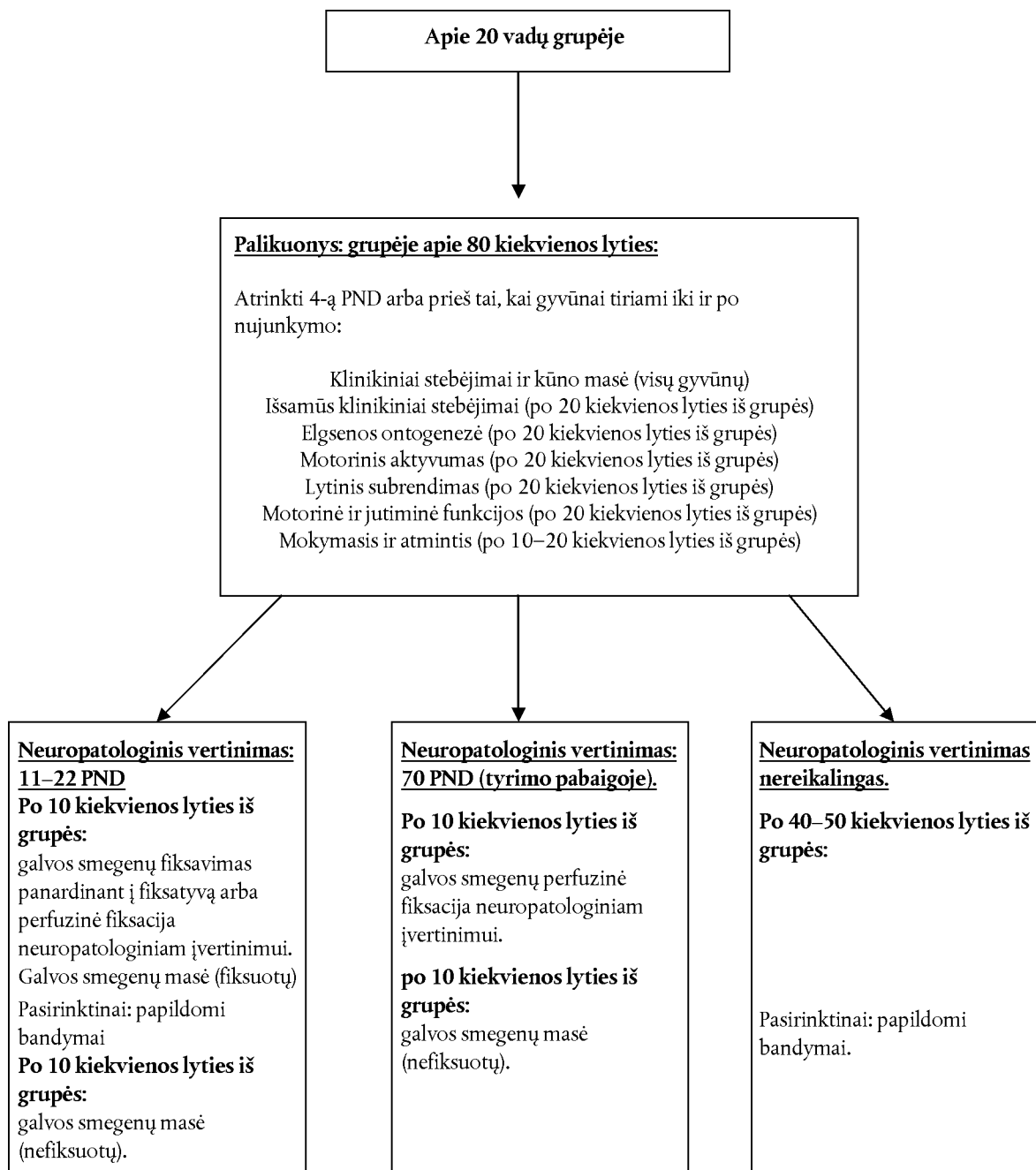
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247–296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed 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, pp. 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 neurotoxins, 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., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, 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., Waalkens-Berendsen, 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. Neuro-pathol. 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, pp. 3–41.
- (88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, 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., Sefovská, 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) Danish Environmental Protection Agency (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.*, 8:21–27.

- (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.

1 pvz.

Bendra funkcinių ir (arba) elgsenos bandymų, neuropatologinio vertinimo ir galvos smegenų masės tyrimo schema. Ši diagrama parengta pagal 13–15 punktuose pateiktą aprašą (PND = postnatalinė diena). Gyvūnų suskirstymo pavyzdžiai pateikti 1 priedėlyje.



1 priedėlis

- Galimo suskirstymo pavyzdžiai aptarti ir išdėstyti lentelėje toliau. Šie pavyzdžiai pateikti norint parodyti, kad tiriamuosius gyvūnus pagal įvairias bandymų paradigmas galima suskirstyti įvairiais būdais.

1 pavyzdys

- Elgsenos ontogenezės bandymams iki nujunkymo naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patiną ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) yra humaniškai numarinami 22 PND. Galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos histopatologiniam vertinimui. Galvos smegenų masės duomenys taip pat yra renkami naudojant likusių to paties dozės lygmens 10 patinėlių ir 10 patelių nefiksuotas galvos smegenis.
- Kita grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui, yra naudojama funkciniais ir (arba) elgsenos bandymams po nujunkymo (atliekami išsamūs klinikiniai stebėjimai, vertinamas motorinis aktyvumas, paaugusių jauniklių reakcija į garsinius dirgiklius ir atliekamas kognityvinės funkcijos bandymas). Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje (apie 70 PND) duodama anestetiko, jie fiksuojami perfuzijos būdu. Po papildomo fiksavimo *in situ* galvos smegenys išimamos ir parengiamos neuropatologiniam vertinimui.
- Jaunų suaugusių gyvūnų (pvz., 60–70 PND amžiaus) kognityvinės funkcijos bandymams naudojama trečia grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (t. y. po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens gyvūnų (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje humaniškai numarinami, jų galvos smegenys išimamos ir pasveriamos.
- 20 likusių kiekvienos lyties iš grupės gyvūnų yra paliekami galimiems papildomiems bandymams atlikti.

1 lentelė

Jauniklio nr. ^(a)		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/Bandymas
V	M		
1	5	20 V + 20 M 10 V + 10 M 10 V + 10 M	Elgsenos ontogenezė 22 PND galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija 22 PND galvos smegenų masė
2	6	20 V + 20 M 20 V + 20 M 20 V + 20 M 20 V + 20 M 20 V + 20 M 10 V + 10 M	Išsamūs klinikiniai stebėjimai Motorinis aktyvumas Lytinis subrendimas Motorinė ir jutiminė funkcijos Mokymasis ir atmintis (25 PND) Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija ~ 70 PND
3	7	20 V + 20 M 10 V + 10 M	Mokymasis ir atmintis (jauni suaugę gyvūnai) Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė ~ 70 PND
4	8	—	Rezerviniai gyvūnai kitiems gyvūnams pakeisti arba papildomiems bandymams atlikti

^(a) Šiame pavyzdyje vados yra išbrokuotos, kad liktų po 4 patinėlius ir 4 pateles; patinėliai žymimi numeriais nuo 1 iki 4, patelės – nuo 5 iki 8.

2 pavyzdys

6. Elgsenos ontogenezės bandymams iki nujunkymo naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) yra humaniškai numarinami 11-ą PND. Galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos histopatologiniam vertinimui.
7. Kita grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui, yra naudojama bandymams po nujunkymo (atliekami išsamūs klinikiniai stebėjimai, vertinamas motorinis aktyvumas, lytinio subrendimo amžius, motorinė ir jutiminė funkcijos). Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje (apie 70 PND) duodama anestetiko, jie fiksuojami perfuzijos būdu. Po papildomo fiksavimo *in situ* galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos neuropatologiniam vertinimui.
8. Paaugusių jauniklių ir jaunų suaugusių gyvūnų kognityvinės funkcijos bandymams naudojama grupė, kurią sudaro po 10 kiekvienos lyties jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. 23 PND amžiaus gyvūnų ir jaunų suaugusių gyvūnų kognityvinei funkcijai bandyti yra naudojami skirtingi gyvūnai. Tyrimo pabaigoje po 10 kiekvienos lyties iš grupės gyvūnų, su kuriais atlikti suaugusiems gyvūnams skirti bandymai, yra numarinami, jų galvos smegenys išimamos ir pasveriamos.
9. 20 likusių kiekvienos lyties iš grupės gyvūnų, kurie nebuvo pasirinkti bandymams, yra numarinami ir sunaikinami po nujunkymo.

2 lentelė

Jauniklio nr. ^(a)		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/bandymas
V	M		
1	5	20 V + 20 M 10 V + 10 M	Elgsenos ontogenezė 11 PND galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija
2	6	20 V + 20 M 20 V + 20 M 20 V + 20 M 20 V + 20 M 10 V + 10 M	Išsamūs klinikiniai stebėjimai Motorinis aktyvumas Lytinis subrendimas Motorinė ir jutiminė funkcijos Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija ~ 70 PND
3	7	10 V + 10 M ^(b)	Mokymasis ir atmintis (23 PND)
3	7	10 V + 10 M ^(b)	Mokymasis ir atmintis (jauni suaugę gyvūnai) Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė
4	8	—	Gyvūnai numarinami ir sunaikinami 21 PND

^(a) Šiame pavyzdyje vados yra išbrokuotos, kad liktų po 4 patinėlius ir 4 pateles; patinėliai žymimi skaičiais nuo 1 iki 4, patelės – nuo 5 iki 8.

^(b) Kognityviniams bandymams yra naudojami skirtingi 23 PND amžiaus jaunikliai ir jauni suaugę gyvūnai (pvz., lyginės arba nelyginės vados, kurių iš viso yra 20).

3 pavyzdys

10. Smegenų masės ir neuropatologiniam vertinimui 11 PND naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) yra humaniškai numarinami 11 PND. Jų galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos histopatologiniam vertinimui. Galvos smegenų masės duomenys taip pat yra renkami naudojant likusių to paties dozės lygmens 10 patinėlių ir 10 patelių nefiksuotas galvos smegenis.

11. Kita grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui, yra naudojama elgsenos ontogenezės (motorinio aktyvumo) tyrimams, tyrimams po nujunkymo (motoriniam aktyvumui ir lytinio subrendimo amžiui vertinti), paaugusių jauniklių kognityvinei funkcijai bandyti.
12. Motorinės ir jutiminės funkcijų (reakcijos į garsinius dirgiklius) bandymams ir išsamiesiems klinikiniais stebėjimams atlikti naudojama viena grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens jauniklių (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje (apie 70 PND) duodama anestetiko, jie fiksuojami perfuzijos būdu. Po papildomo fiksavimo *in situ* galvos smegenys išimamos, pasveriamos ir parengiamos neuropatologiniam vertinimui.
13. Jaunų suaugusių gyvūnų kognityvinės funkcijos bandymams yra naudojama grupė, kurią sudaro po 20 kiekvienos lyties jauniklių (t. y. po 1 patinėlį ir 1 patelę iš vados) vienam dozės lygmeniui. Iš šių gyvūnų po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens gyvūnų (t. y. po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados) tyrimo pabaigoje humaniškai numarinami, jų galvos smegenys išimamos ir pasveriamos.

3 lentelė

Jauniklio nr. ^(a)		Bandymui paskirtų jauniklių skaičius	Tyrimas/bandymas
V	M		
1	5	10 V + 10 M 10 V + 10 M	11 PND galvos smegenų masė/neuropatologinė morfometrija 11 PND galvos smegenų masė
2	6	20 V + 20 M 20 V + 20 M 20 V + 20 M 20 V + 20 M	Elgsenos ontogenezė (motorinis aktyvumas) Motorinis aktyvumas Lytinis subrendimas Mokymasis ir atmintis (27-ą PND)
3	7	20 V + 20 M 20 V + 20 M 10 V + 10 M	Reakcija į garsinį dirgiklį (paaugusiems jaunikliams ir jauniems suaugusiems gyvūnams) Išsamūs klinikiniai stebėjimai Jaunų suaugusių gyvūnų galvos smegenų masė/neuropatologija 70 PND morfometrija
4	8	20 V + 20 M 10 V + 10 M	Mokymasis ir atmintis (jauni suaugę gyvūnai) Jaunų suaugusių gyvūnų smegenų masė

^(a) Šiame pavyzdyje vados yra išbrokuotos, kad liktų po 4 patinėlius ir 4 pateles; patinėliai žymimi numeriais nuo 1 iki 4, patelės – nuo 5 iki 8.

*2 priedėlis***Sąvokos**

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga: bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

B.54. POVEIKIU GRAUŽIKŲ GIMDAI PAGRĮSTA BIOANALIZĖ. TRUMPALAIKIS ESTROGENINIŲ SAVYBIŲ ATRANKOS BANDYMAS**ĮVADAS**

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. *OECD Test Guideline* (TG)) Nr. 440 (2007). 1998 m. EBPO iniciatyva pradėtas didelės svarbos darbas – peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas galimai endokrininę sistemą ardančių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. Viena iš šio darbo dalių – parengti poveikiu graužikų gimdai pagrįstos bioanalizės gaires. Paskui buvo įgyvendinta plati poveikiu graužikų gimdai pagrįstos bioanalizės tinkamumo patvirtinimo programa, be kita ko, buvo parengtas dokumentas su išsamia įvagine informacija (2) (3), atlikti platūs tyrimai vienoje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose siekiant parodyti bioanalizės su stipriu etaloniniu estrogenu, silpnais estrogenų receptorių agonistais, stipriu estrogenų receptorių antagonistu ir neigiamu etalonine chemine medžiaga aktualumą ir atkuriamumą (4) (5) (6) (7) (8) (9). Šis bandymų metodas B.54 yra paremtas patirtimi, įgyta įgyvendinant tinkamumo patvirtinimo bandymo programą, ir per šią programą gautais estrogenų agonistų tyrimo rezultatais.
2. Poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra trumpalaikis atrankos bandymas, sukurtas 4-ajame dešimtmetyje (27) (28), pirmą kartą ekspertų komitetas jį standartizavo atrankai atlikti 1962 m. (32) (35). Jis pagrįstas gimdos masės didėjimu arba poveikį gimdai turinčiu atsaku (jei norite susipažinti išsamiau, žr. 29). Jį atliekant vertinama, ar cheminė medžiaga gali paskatinti biologinį aktyvumą, atitinkantį natūralių estrogenų (pvz., 17β-estradiolio) agonistų arba antagonistų veikimą, tačiau šis bandymas antagonistams nustatyti taikomas daug rečiau negu agonistams. Gimda į estrogenus reaguoja dvejopai. Pirminis atsakas yra masės padidėjimas dėl vandens sugėrimo. Paskui audiniui augant ima didėti masė (30). Žiurkių ir pelių gimdos atsakas kokybiniu požiūriu yra panašus.
3. Ši bioanalizė yra *in vivo* atrankos analizė, jos taikymą reikėtų vertinti pagal EBPO Konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (angl. *Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) (2 priedėlis). Pagal šią konceptualią sistemą poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra 3 lygmens *in vivo* analizė, kurią atliekant gaunama duomenų apie vieną endokrininės sistemos mechanizmą, t. y. estrogeninį poveikį.
4. Poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra sukurta kaip *in vitro* ir *in vivo* bandymų serijos dalis, ji yra skirta cheminėms medžiagoms, kurios gali sąveikauti su endokrinine sistema, nustatyti ir taip padėti atlikti rizikos žmogaus sveikatai ir aplinkai vertinimą. EBPO tinkamumo patvirtinimo programoje buvo naudojami ir stiprūs, ir silpni estrogenų agonistai siekiant įvertinti, kaip analizė padeda nustatyti estrogenines chemines medžiagas (4) (5) (6) (7) (8). Šia programa buvo aiškiai parodytas bandymų metodo jautrumas estrogenų agonistams nustatyti ir gauti geri atkuriamumo toje pačioje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose rezultatai.
5. Kalbant apie neigiamas chemines medžiagas, į tinkamumo patvirtinimo programą įtraukta tik viena etaloninė cheminė medžiaga, poveikiu gimdai pagrįsta analizė ir *in vitro* išimosis prie receptorių bei receptorių analizė patvirtinta kaip „neigiamą“; taip pat buvo įvertinti papildomi bandymų duomenys, nesusiję su EBPO tinkamumo patvirtinimo programa, kuriais dar išsamiau patvirtintas poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės tinkamumas estrogenų agonistų atrankai atlikti (16).

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

6. Estrogenų agonistai ir antagonistai veikia kaip estrogenų receptorių a ir b ligandai ir gali atitinkamai skatinti arba slopinti transkripcinę receptorių veiklą. Dėl to gali kilti pavojus sveikatai, įskaitant poveikį dauginimuisi ir vystymuisi. Dėl to cheminę medžiagą reikia greitai įvertinti ir nustatyti, ar ji gali veikti kaip estrogeno agonistas arba antagonistas. Nors ligandų išimosis prie estrogenų receptorių afiniškumas arba reporterinių genų transkripcijos aktyvinimas *in vitro* yra informatyvus veiksnys, jis yra tik vienas iš keleto galimo pavojaus determinantų. Kiti galimi determinantai – tai metabolinis aktyvavimas ir deaktyvavimas patekus į organizmą, pasiskirstymas tiksliniuose audiniuose, pašalinimas iš organizmo, priklausantis, bent jau iš dalies, nuo bandomosios cheminės medžiagos ir jos davimo būdo. Dėl to reikia atlikti galimo cheminės medžiagos veikimo *in vivo* atitinkamomis sąlygomis atrankos bandymą, išskyrus tuos atvejus, kai reikiama informacija jau būna turima iš cheminės medžiagos absorbcijos, pasiskirstymo, metabolizmo, pašalinimo (ADME) charakteristikos. Gimdos audiniai, ypač laboratorinių graužikų, kurių rujos ciklas trunka apie 4 dienas, reaguoja į stimuliaciją estrogenais sparčiai ir energingai augdami. Įvairių rūšių graužikai, ypač žiurkės, taip pat plačiai naudojami toksikumo tyrimuose pavojingumui apibūdinti. Todėl graužiko gimda yra tinkamas tikslinis organas estrogenų agonistų ir antagonistų *in vivo* atrankos bandymui atlikti.
7. Šis bandymų metodas yra pagrįstas tais EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrime naudotais protokolais, kurie ir vienos laboratorijos, ir skirtingų laboratorijų tyrimuose patvirtinti kaip patikimi ir atkartojami (5) (7). Šiuo metu galima taikyti du metodus, tai yra: suaugusių patelių, kurioms atlikta ovariektomija, t. y. OVX suaugusių patelių

metodą ir nesubrendusių patelių, kurioms neatlikta ovariektomija, t. y. nesubrendusių patelių metodą. Per EBPO tinkamumo patvirtinimo bandymo programą buvo įrodyta, kad abiejų metodų jautrumas ir atkuriamumas yra panašūs. Tačiau, kadangi nesubrendusio gyvūno pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų (angl. HPG) ašis dar neaktyvi, šis metodas yra ne toks specifiškas, bet apima platesnį tyrimą negu tada, kai naudojamas gyvūnas, kuriam atlikta ovariektomija, nes nesubrendęs gyvūnas gali reaguoti į chemines medžiagas, kurios sąveikauja su pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašimi, ne tik su estrogeno receptoriais. Žiurkių pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis ima funkcionuoti maždaug 15 dieną po atsivedimo. Iki tol paspartinti subrendimo duodant, pavyzdžiui, GnRH, negalima. Artėjant patelių lytinio subrendimo laikui, iki makšties atsivėrimo patelėi įvyksta keli tušti ciklai, per kuriuos makštis neatsiveria ir ovuliacija neįvyksta, tačiau būna tam tikrų hormoninių svyravimų. Jeigu chemine medžiaga pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis yra tiesiogiai arba netiesiogiai stimuliuojama, patelė anksti subręsta, anksti vyksta ovuliacija, spartėja makšties atsivėrimo procesas. Tokį poveikį daro ne tik cheminės medžiagos, kurios veikia pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašį, – kai kurie pašarai, kurių metabolizuojančios energijos lygis yra didesnis, skatina augimą ir spartina makšties atsivėrimą, nors nėra estrogeniniai. Tokios cheminės medžiagos OVX suaugusiems gyvūnams nesukels poveikį gimdai turinčio atsako, nes jų pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis nefunkcionuoja.

8. Rūpinantis gyvūnų gerove reikėtų taikyti tą metodą, pagal kurį naudojamos nesubrendusios žiurkės, vengti chirurginio gyvūnų paruošimo, stengtis, jei galima, nenaudoti tų gyvūnų, kurie turi kokių nors rudos pradžios požymių (žr. 30 punktą).
9. Poveikį gimdai turintis atsakas būna ne vien estrogeninės kilmės, t. y. atsaką gali sukelti ir kitos cheminės medžiagos, ne vien estrogenų agonistai arba antagonistai. Pavyzdžiui, santykinai didelės progesterono, testosterono arba įvairių sintetinių progestinų dozės gali daryti stimuliuojamąjį poveikį (30). Bet kurį atsaką galima ištirti histologiškai ir patikrinti, ar makščiai daromas keratinizavimo ir ragėjimo poveikis (30). Kad ir kokios kilmės būtų galimas atsakas, teigiami poveikiai gimdai pagrįstos bioanalizės rezultatai paprastai turėtų paskatinti imtis tolesnių aiškinimosi tyrimų. Papildomų duomenų apie estrogeninį poveikį galima gauti atliekant *in vitro* analizę, pavyzdžiui, rišimosi prie ER, transkripcijos aktyvinimo analizę, arba *in vivo* analizę, pavyzdžiui, patelių lytinio subrendimo analizę.
10. Atsižvelgiant į tai, kad poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra *in vivo* atrankos analizė, pasirinktas tinkamumo patvirtinimo metodas padėjo ir atsižvelgti į gyvūnų gerovę, ir laikytis daugiapakopį bandymų strategijos. Todėl atliekant analizę buvo stengiamasi tiksliai patvirtinti estrogeninio poveikio – tai svarbiausias rūpestis, kylantis dėl daugelio cheminių medžiagų, – rezultatų atkuriamumą ir jautrumą, bet mažai dėmesio skirta antiestrogeninio poveikio aspektams. Buvo išbandytas tik vienas stipriai veikiantis antiestrogenas, nes akivaizdžiai antiestrogeninio pobūdžio (kurio nenustelbia tam tikras estrogeninis poveikis) cheminių medžiagų yra labai nedaug. Šis bandymų metodas taikomas pagal estrogeninio poveikio protokolą, o protokolą, kuriame aptariamas antagonistų analizės būdas, yra pateiktas Rekomendaciniame dokumente (37). Cheminių medžiagų, darančių grynai antiestrogeninį poveikį, analizės atkuriamumas ir jautrumas bus išsamiau apibrėžtas vėliau, bandymų metodikai tapus įprasta, kurį laiką ją panaudojus ir nustatius daugiau tokio pobūdžio poveikį turinčių cheminių medžiagų.
11. Pripažįstama, kad visos procedūros, kurioms naudojami gyvūnai, turi atitikti gyvūnų priežiūros vietinius reikalavimus; toliau nurodyti gyvūnų priežiūros ir elgesio su gyvūnais reikalavimai yra būtiniausi veiklos reikalavimai ir už juos viršesni yra vietiniai reikalavimai, pavyzdžiui, 2010 m. rugėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (38). Daugiau humaniško elgesio su gyvūnais gaires galima rasti EBPO (25).
12. Kaip ir prieš bet kurią kitą analizę, kuriai atlikti naudojami gyvi gyvūnai, prieš pradedant šią analizę itin svarbu įsitikinti, kad duomenys tikrai reikalingi. Pavyzdžiui, dvi sąlygos, kada duomenys gali būti reikalingi, yra tokios:
 - yra didelė sąlyčio tikimybė (konceptualios sistemos (2 priedėlis) 1 lygmuo) arba estrogeninio poveikio požymiai (2 lygmuo) ir siekiama nustatyti, ar toks poveikis gali pasireikšti *in vivo*;
 - atliekant 4 arba 5 lygmens *in vivo* bandymus nustatoma estrogeninio poveikio požymių ir yra siekiama pagrįsti, kad šis poveikis yra susijęs su estrogenų mechanizmu, kurio *in vitro* bandymu išsiaiškinti neįmanoma.
13. Sąvokos, vartojamos šiame bandymų metodo aprašyme, pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

14. Poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės jautrumas paremtas bandymų su gyvūnais sistema, pagal kurią pogumburio–hipofizės–kiaušidžių ašis nefunkcionuoja, dėl to endogeninis cirkuliuojančių estrogenų lygis yra žemas. Taip užtikrinama maža pradinė gimdos masė ir didžiausias galimas atsako į duodamus estrogenus spektras. Yra dvi šį reikalavimą atitinkančios graužikų patelių būsenos, kada jos yra jautrios estrogenams:
- i) kol patelės yra nesubrendusios, po nujunkymo iki lytinio subrendimo, ir
 - ii) jaunos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariektomija, praėjus pakankamai laiko, kad gimdos audiniai galėtų regresuoti.
15. Bandomoji cheminė medžiaga duodama kasdien per virškinamąjį traktą, naudojant zondą, arba poodinėmis injekcijomis. Skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės duodamos ne mažiau kaip dviem dozėmis gaunančioms bandomųjų gyvūnų grupėms (paaiškinimai pateikti 33 punkte), kiekvienai grupei duodant po vieno dydžio dozę: pagal nesubrendusių gyvūnų metodą – tris dienas iš eilės, pagal OVX suaugusių gyvūnų metodą – ne trumpiau kaip tris dienas iš eilės. Gyvūnų nekroskopija atliekama praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės dozės davimo. Tiriant estrogenų agonistus vertinama, ar dozės gaunančių grupių gyvūnų gimdos masės padidėjimo vidurkis yra statistiškai reikšmingas, palyginti su nešiklio grupe. Statistiškai reikšmingas dozės gaunančios grupės gyvūnų gimdos masės vidurkio padidėjimas rodo, kad per šią bioanalizę gautas teigiamas atsakas.

METODO APRAŠYMAS

Gyvūnų rūšies parinkimas

16. Galima naudoti dažniausiai naudojamų veislių laboratorinius graužikus. Pavyzdžiui, tinkamumo patvirtinimo tikslais naudotos Sprague-Dawley ir Wistar veislių žiurkės. Jei žinoma arba įtariama, kad kai kurių veislių gyvūnų gimda reaguoja ne taip jautriai, tokių gyvūnų naudoti nereikėtų. Laboratorija turėtų įrodyti naudojamos veislės gyvūnų jautrumą taip, kaip aptarta 26 ir 27 punktuose.
17. Poveikiu gimdai pagrįstai bioanalizei atlikti nuo 4-ojo dešimtmečio dažniausiai buvo naudojamos žiurkės ir pelės. EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atliekami tik su žiurkėmis, laikantis nuomonės, kad abi rūšys turėtų būti lygiavertės ir kad, siekiant saugoti išteklius ir gyvūnus, tinkamumui visame pasaulyje patvirtinti turėtų pakakti vienos rūšies. Toksiškumo dauginimuisi ir vystymuisi tyrimuose dažniausiai pasirenkama rūšis yra žiurkės. Kadangi jau anksčiau sukaupta plati duomenų apie peles bazė, siekiant poveikiu graužikų gimdai pagrįstą bioanalizės metodą išplėsti pritaikant jį pelėms, kaip bandomųjų gyvūnų rūšiai, su pelėmis atliktas riboto masto kontrolinis tinkamumo patvirtinimo tyrimas. Laikantis pradinio siekio saugoti išteklius ir gyvūnus, pasirinktas tarpinis metodas, pagal kurį buvo panaudota nedaug bandomųjų cheminių medžiagų, dalyvavo nedaug laboratorijų ir nebuvo naudoti koduoti mėginių bandymai. Iš šio tarpinio tinkamumo patvirtinimo tyrimo matyti, kad poveikiu jaunų suaugusių pelių, kurioms atlikta ovariektomija, gimdai pagrįsta bioanalizė ir kokybiniu, ir kiekybiniu požiūriu tiksliai atitinka žiurkių tyrimo duomenis. Jei poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė yra pradinė, atliekama prieš ilgalaikį tyrimą, abiem tyrimams galima naudoti tos pačios veislės ir to paties šaltinio gyvūnus. Pagal tarpinį metodą naudotos tik OVX pelės ir ataskaitoje nėra pateikiama pakankamai tvirtų duomenų nesubrendusių pelių modelio tinkamumui patvirtinti, todėl šiame bandymų metode į nesubrendusių pelių modelį nebuvo atsižvelgta.
18. Taigi kai kuriais atvejais vietoj žiurkių galima naudoti peles. Jeigu pasirenkama ši gyvūnų rūšis, pasirinkimą reikėtų pagrįsti pagal toksikologinius, farmakokinetinius ir (arba) kitus kriterijus. Jei naudojamos pelės, protokolą gali tekti pakeisti. Pavyzdžiui, pelių pašaro suvartojimas pagal kūno masę yra didesnis už žiurkių, todėl fitoestrogeno kiekis pelėms duodamuose pašaruose turėtų būti mažesnis negu žiurkėms duodamuose pašaruose (9) (20) (22).

Laikymo ir šėrimo sąlygos

19. Visos procedūros turėti atitikti vietos laboratorinių gyvūnų priežiūros standartus. Šiose nuostatose pateikti būtiniausi gyvūnų priežiūros ir elgesio su gyvūnais reikalavimai, vietos taisyklės, pavyzdžiui, 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, yra už juos viršesnės. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C (gali svyruoti ± 3 °C). Santykinė drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką. Reikėtų siekti, kad santykinė drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis. Per parą apšvietimo seka turėtų būti 12 h šviesos ir 12 h tamsos.
20. Laboratorinis pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. Jauni suaugę gyvūnai narveliuose gali būti laikomi atskirai arba tos pačios lyties grupėmis po tris. Dėl jauno nesubrendusių gyvūnų amžiaus juos laikyti rekomenduojama socialinėmis grupėmis.

21. Yra žinoma, kad didelis fitoestrogenų kiekis laboratoriniuose pašaruose pakankamai smarkiai skatina graužikų gimdos masę didėti – tiek, kad tai gali trukdyti atlikti poveikiu gimdai pagrįstą bioanalizę (13) (14) (15). Kai naudojami nesubrendę gyvūnai, didelis fitoestrogenų kiekis laboratoriniuose pašaruose ir jų metabolizuojanti energija taip pat gali paskatinti ankstyvą lytinį subrendimą. Fitoestrogenų pašaruose visų pirma atsiranda dėl to, kad į juos dedama sojos ir alfalfa produktų, iširta, kad fitoestrogenų kiekis įvairiose laboratorinių pašarų partijose būna skirtingas (23). Kūno masė yra svarbus kintamasis, nes vartojamo pašaro kokybė yra susijusi su kūno mase. Todėl su tokiais pačiais pašarais faktiškai suvartojamas fitoestrogenų kiekis, lyginant skirtingų rūšių ir amžiaus gyvūnus, gali skirtis (9). Nesubrendusios žiurkių patelės pašaro pagal kūno masę gali suvartoti maždaug dukart daugiau negu jaunos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariectomija. Jaunos suaugusios pelės pašaro pagal kūno masę gali suvartoti maždaug keturiskart daugiau negu jaunos suaugusios žiurkių patelės, kurioms atlikta ovariectomija.
22. Tačiau poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės rezultatai (9) (17) (18) (19) rodo, kad nedidelis fitoestrogenų kiekis pašaruose yra priimtinas ir nemažina bioanalizės jautrumo. Rekomenduojama, kad fitoestrogenų kiekis jaunoms Sprague Dawley ir Wistar veislių žiurkėms duodamuose pašaruose sudarytų ne daugiau kaip 350 µg genisteino ekvivalentų vienam laboratorinio pašaro gramui (6) (9). Tokį pašarą taip pat tiktų naudoti, kai bandymas atliekamas su jaunomis suaugusiomis žiurkių patelėmis, kurioms atlikta ovariectomija, nes jauni gyvūnai, palyginti su nesubrendusiais gyvūnais, pašaro pagal kūno masę suvartoja mažiau. Jeigu reikia naudoti peles, kurioms atlikta ovariectomija, arba fitoestrogenams jautresnes žiurkes, reikėtų apsvarstyti galimybę proporcingai sumažinti fitoestrogenų kiekį pašaruose (20). Be to, dėl skirtingos įvairių pašarų metabolinės energijos gali keistis lytinio brendimo pradžios laikas (21) (22).
23. Prieš tyrimą reikėtų kruopščiai pasirinkti pašarus, kad jų fitoestrogenų (paaiškinimai pateikti (6) (9)) arba metabolizuojančios energijos kiekis nebūtų padidintas, nes tai gali iškreipti rezultatus (15) (17) (19) (22) (36). Tam, kad laboratorijos taikoma bandymo sistema veiktų tinkamai, taip, kaip nurodyta 26 ir 27 punktuose, svarbu patikrinti abu šiuos veiksnius. Kaip gerą laboratorijos praktiką (GLP) atitinkanti apsauginė priemonė turėtų būti paimtas reprezentatyvus kiekvienos pašarų, duodamų per tyrimą, partijos mėginys, kad būtų galima ištirti juose esančių fitoestrogenų kiekį (pvz., kai gimdos kontrolinis svoris, palyginti su ankstesniais kontroliniais duomenimis, yra didelis arba kai atsakas į etaloninį estrogeną, 17 alfa-etinilestradiolį, yra neadekvatus). Alikvotines dalis reikėtų išanalizuoti per tyrimą arba užšaldyti – 20 °C temperatūroje ar taip, kad mėginys iki analizės nesuirtų.
24. Kai kurio kraiko sudėtyje gali būti natūraliai susidariusių estrogeninių arba antiestrogeninių cheminių medžiagų (pvz., yra žinoma, kad kukurūzų burbuolės kotai veikia žiurkių rujos cikliškumą ir yra antiestrogeniniai). Pasirinktame kraike turėtų būti kuo mažesnis fitoestrogenų kiekis.

Gyvūnų paruošimas

25. Bandomieji gyvūnai, neturintys ligos arba fizinių anomalijų požymių, yra atsitiktine tvarka suskirstomi į kontrolinę ir dozes gaunančias grupes. Narveliai turėtų būti išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Gyvūnus reikėtų paženklinėti unikaliomis žymomis. Nesubrendusius gyvūnus aklimatizacijos laikotarpiu iki nujunkymo geriau laikyti viename narvelyje su motininėmis arba kitomis žindančiomis patelėmis. Jaunų suaugusių gyvūnų ir nesubrendusių gyvūnų, kurie pristatyti kartu su motininėmis patelėmis arba kitomis žindančiomis patelėmis, aklimatizacijos laikotarpis iki tyrimo pradžios turėtų trukti apie 5 dienas. Jeigu nesubrendę gyvūnai yra įsigyti jau nujunkyti ir be motininų patelių, aklimatizacijos laikotarpį gali tekti sutrumpinti, nes dozes reikėtų pradėti duoti iškart po nujunkymo (žr. 29 punktą).

BANDYMO PROCEDŪRA

Laboratorijos kompetencijos patikrinimas

26. Laboratorijos kompetenciją patikrinti galima dvejopai:
- periodiškai tikrinti pagal pradinio bazinio teigiamo kontrolinio tyrimo rezultatus (žr. 27 punktą). Ne rečiau kaip kas 6 mėnesius ir kaskart, kai atsiranda pokytis, galintis paveikti analizės eigą (pvz., nauji pašarai, skrodimus atliekančio personalo pasikeitimas, gyvūnų veislės arba tiekėjo pasikeitimas ir t. t.), reikėtų patikrinti bandymo sistemos (gyvūnų modelio) jautrumą, tam panaudojant atitinkamą etaloninio estrogeno 17a-etinilestradiolio (CAS Nr. 57–63–6) (EE) dozę (remiantis 27 punkte nurodyto bazinio teigiamo kontrolinio tyrimo rezultatais);
 - vykdyti lygiagrečią kontrolę, į kiekvieną analizę įtraukiant grupę, kuriai duodama atitinkama etaloninio estrogeno dozė.

Jeigu sistema reaguoja ne taip, kaip tikėtasi, bandymo sąlygas reikėtų išnagrinėti ir atitinkamai pakeisti. Rekomenduojama etaloninio estrogeno dozė, kuri būtų naudojama pagal bet kurį iš būdų, sudarytų ED70–80.

27. **Bazinis teigiamas kontrolinis tyrimas** – laboratorija prieš pirmą kartą atlikdama tyrimą pagal šį bandymų metodą turėtų patikrinti savo kompetenciją, t. y. išbandyti gyvūnų modelio jautrumą nustatydamas atsaką į etaloninio estrogeno 17a-etinilestradiolio (CAS Nr. 57–63–6) (EE) dozę, kai skiriamos ne mažiau kaip keturios dozės. Gimdos masės atsakas bus palygintas su turimais ankstesniais duomenimis (žr. literatūros sąrašo 5 punktą). Jeigu šis bazinis teigiamas kontrolinis tyrimas neduoda lauktų rezultatų, bandymo sąlygas reikėtų išnagrinėti ir atitinkamai pakeisti.

Gyvūnų skaičius ir būklė

28. Kiekvienoje dozės gaunančioje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti mažiausiai 6 gyvūnai (ir pagal nesubrendusių gyvūnų, ir pagal OVX suaugusių gyvūnų metodo protokolus).

Nesubrendusių gyvūnų amžius

29. Kai poveikiu gimdai pagrįstai bioanalizei atlikti naudojami nesubrendę gyvūnai, būtina nurodyti jų atsivedimo datą. Dozės reikėtų pradėti duoti pakankamai anksti, siekiant užtikrinti, kad cheminės medžiagos vartojimo pabaigoje fiziologinis endogeninių estrogenų, susijusių su lytiniu brendimu, pakilimas dar nebūtų prasidėjęs. Kita vertus, turima duomenų, kad labai jauni gyvūnai gali būti ne tokie jautrūs. Apibrėždama optimalų amžių kiekviena laboratorija turėtų atsižvelgti į savo pačios turimus brendimo duomenis.

Bendra rekomendacija – žiurkėms dozės pradėti duoti iš karto po ankstyvo nujunkymo 19 postnatalinę dieną (atsivedimo diena yra žymima kaip 0 postnatalinė diena). Žiurkėms dozės baigti duoti geriausia 21 postnatalinę dieną ir bet kokių atveju – iki 25 postnatalinės dienos, nes sukakus šiam amžiui pradeda funkcionuoti pogumburio-hipofizės–kiaušidžių ašis ir endogeniniai estrogeno lygiai gali pradėti kilti, kartu gali padidėti pradinė gimdos masė ir grupės standartiniai nuokrypiai (2) (3) (10) (11) (12).

Ovariektomijos procedūra

30. Kai naudojamos žiurkių ir pelių patelės (dozės gaunanti ir kontrolinė grupės), kurioms reikia atlikti ovariektomiją, tai turėtų būti atlikta 6–8 jų amžiaus savaitę. Kai ovariektomija atliekama žiurkėms, nuo ovariektomijos iki pirmos dozės davimo turėtų praeiti ne mažiau kaip 14 dienų, kad gimda regresuotų iki minimalios, stabilios pradinės būklės. Nuo pelėms atliktos ovariektomijos iki pirmos dozės davimo turėtų praeiti bent 7 dienos. Kadangi nedidelis kiaušidžių audinio kiekis yra pakankamas, kad pasigamintų reikšmingas cirkuliuojančių estrogenų (3) kiekis, prieš naudojant gyvūnus reikėtų patikrinti – bent penkias dienas iš eilės (pvz., 10–14 dieną po ovariektomijos, kai ji atlikta žiurkėms) stebėti iš makšties paimto tepinėlio epitelines ląsteles. Jeigu yra kokių nors požymių, kad prasideda gyvūnų ruja, šių gyvūnų nereikėtų naudoti. Vėliau per nekroskopiją reikėtų ištirti kiaušidžių pašalinimo vietas ir patikrinti, ar nėra kiaušidžių audinio likučių. Jei yra, to gyvūno reikėtų neįskaityti į atliekamus skaičiavimus (3).
31. Ovariektomijos procedūra pradėdama gyvūnui esant pilvo (kniūbščioje) gulimojoje padėtyje, jį tinkamai nuskaudus. Pjūvis dorsolateralinei pilvo senelei atverti turėtų būti apie 1 cm ilgio ir daromas per vidurį tarp šonkaulių krašto ir kryžkaulio, per kelis milimetrus atitrauktas į šoną link lateralinės strėnų raumens ribos. Kiaušides iš pilvo ertmės reikėtų išimti ant sterilaus paviršiaus. Kiaušides reikėtų atskirti kiaušintakių ir gimdos susijungimo vietose. Įsitikinus, kad nėra didelio kraujavimo, pilvo sienelę reikėtų susiūti, odą sukabinti chirurginėmis kabėmis arba atitinkamai susiūti. Perišimo taškai schematiškai parodyti 1 pvz., Po operacijos reikėtų taikyti tinkamą analgeziją pagal graužikų gydymo patirties turinčio veterinarijos gydytojo rekomendacijas.

Kūno masė

32. Kai taikomas OVX suaugusio gyvūno metodas, kūno masė ir gimdos masė nekoreliuoja, nes gimdos masę veikia hormonai, pavyzdžiui, estrogenai, o ne augimo veiksniai, nuo kurių priklauso kūno dydis. Kai taikomas nesubrendusių gyvūnų modelis, kol gyvūnas bręsta, kūno masė, priešingai, būna susijusi su gimdos mase (34). Taigi, kai taikomas nesubrendusių gyvūnų modelis, naudojamų gyvūnų masės variacija tyrimo pradžioje turi būti kuo

mažesnė ir neviršyti $\pm 20\%$ vidutinės masės. Tai reiškia, kad veisėjas turėtų standartizuoti vados dydį ir taip užtikrinti, kad skirtingų motininių gyvūnų palikuonys būtų šeriami maždaug vienodai. Gyvūnus reikėtų suskirstyti į grupes (kontrolinę ir gaunančią dozes) atsitiktine tvarka pagal masę, kad kiekvienos grupės kūno masės vidurkis statistiškai nesiskirtų nuo kitų grupių. Reikėtų stengtis į tą pačią dozes gaunančią grupę, jei įmanoma, neskirti tos pačios vados gyvūnų nepadidinus tyrimui naudojamų vadų skaičiaus.

Dozavimas

33. Norint nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga gali daryti estrogeninį poveikį *in vivo*, paprastai pakanka dviejų dydžių dozės grupių ir kontrolinės grupės, todėl rūpinantis gyvūnų gerove tokiai struktūrai yra teikiama pirmenybė. Jeigu yra siekiama nubrėžti dozės ir atsako tarpusavio ryšio kreivę arba duomenis ekstrapoliuoti mažesnėms dozėms, reikalingos bent trijų dydžių dozės grupės. Jeigu reikalinga informacija ne tik apie estrogeninį veikimą (pavyzdžiui, reikia įvertinti stiprumą), reikėtų pasirinkti kitokį dozavimo režimą. Kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jiems neduodama bandomosios cheminės medžiagos. Jei bandomajai cheminei medžiagai duoti yra naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti tokį patį nešiklio kiekį, koks yra duodamas dozės gaunančioms grupėms (arba didžiausią jo kiekį iš duodamo dozės gaunančioms grupėms, kai šis kiekis skirtingose grupėse yra skirtingas).
34. Kai atliekama poveikiu gimdai pagrįsta bioanalizė, reikia parinkti tokias dozes, kad būtų užtikrinta, jog gyvūnas nenugaiš, ir kad praėjus trims dienoms iš eilės nuo cheminės medžiagos davimo pradžios dozė didinant iki maksimalaus 1 000 mg/kg per dieną kiekio gyvūnams dar nepasireikštų reikšmingas toksiškas poveikis ir jie nepatirtų didelių kančių. Visus dozės dydžius reikėtų siūlyti ir pasirinkti atsižvelgiant į jau turimus bandomosios cheminės medžiagos ar jai giminingų medžiagų toksiškumo ir (toksiko)kinetinius duomenis. Pasirenkant didžiausią dozę pirmiausia reikėtų atsižvelgti į LD50 ir (arba) ūmaus toksiškumo informaciją, kad būtų išvengta gyvūnų mirties, didelio skausmo arba kančių (24) (25) (26). Didžiausia dozė turėtų atitikti maksimalią toleruojamą dozę (MTD); tyrimas, atliktas su tokio dydžio doze, kurią duodant pasireiškė teigiamas poveikis gimdai turintis atsakas, taip pat būtų tinkamas. Atrankos tikslais dideli intervalai (pvz., po pusę log vieneto, o tai atitinka dozės progresiją 3,2, arba net po vieną log vieneta) tarp dozių dažniausiai būna priimtini. Jeigu tinkamų duomenų dozėms nustatyti nėra, galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą, kuris padėtų nustatyti, kokias dozes naudoti.
35. Kitu atveju, jeigu agonisto estrogeninio poveikio stiprumą galima įvertinti pagal *in vitro* (arba *in silico*) duomenis, pasirenkant dozę į juos taip pat galima atsižvelgti. Pavyzdžiui, bandomosios cheminės medžiagos kiekis, kuris sukeltų tokį patį poveikį gimdai turintį atsaką kaip etaloninis agonistas (etinilestradiolis), yra įvertinamas pagal jo santykinį *in vitro* poveikio stiprumą, palyginti su etinilestradioliu. Didžiausia bandomoji dozė būtų apskaičiuota padauginus šį dozės ekvivalentą iš atitinkamo koeficiento, pvz., 10 arba 100.

Dozės dydžio intervalo nustatymas

36. Jeigu reikia, iš pradžių galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą su keliais gyvūnais. Šiuo tikslu toksiškumo gyvūnams arba kančių klinikiniais požymiais apibūdinti galima remtis EBPO Rekomendaciniu dokumentu Nr. 19 (25). Jeigu pagal šį dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą tai yra įmanoma, po trijų dozės davimo dienų, praėjus 24 valandoms po paskutinės dozės davimo, gimdą galima išpjauti ir pasverti. Šiais duomenimis paskui galima pasinaudoti pagrindiniame tyrime (pasirenkant tinkamą maksimalią ir mažesnę dozes, dozių grupių skaičių).

Dozių davimas

37. Bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąjį traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis. Pasirenkant davimo būdą reikia atsižvelgti į gyvūnų gerovės, toksikologinius aspektus, pavyzdžiui, artimumą žmonių sąlyčio su chemine medžiaga būdai (pvz., naudojant zondą atkartojamas sąlytis per virškinamąjį traktą, poodinėmis injekcijomis – sąlytis per kvėpavimo takus arba sugertis per odą), fizikines ir (arba) chemines bandomosios medžiagos savybes, ypač į turimą toksikologinę informaciją ir duomenis apie metabolizmą ir kinetiką (t. y. tai, kad reikia vengti pirmojo pasąžo metabolizmo, arba tai, kad poveikis būna didesnis, jei duodama tam tikru būdu).
38. Jei yra įmanoma, pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpalą ir (arba) suspensiją. Bet dauguma estrogenų ligandų arba jų metabolinių prekursorių dažnai būna hidrofobiniai, todėl dažniausiai naudojamas tirpalas ir (arba) aliejinė suspensija (pvz., su kukurūzų, žemės riešutų, sezamo arba alyvuogių aliejumi). Tačiau šių aliejų kaloringumas ir jų sudėtyje esančių riebalų kiekis yra nevienodas, taigi nešiklis gali paveikti bendrą metabolizuojančios energijos (ME) įsisavinimą ir dėl to pakeisti matuojamas vertinamąsias baigtis, pavyzdžiui, gimdos masę, ypač kai taikomas nesubrendusių gyvūnų metodas (33). Taigi prieš atliekant tyrimą visus ketinamus naudoti nešiklius

reikėtų išbandyti per kontrolinius bandymus be nešiklio. Bandomąsias chemines medžiagas galima ištirpinti minimaliame kiekyje 95 % etanolio arba kito atitinkamo tirpiklio ir atskiesti iki darbinės koncentracijos, esančios bandomajame nešiklyje. Toksiškos tirpiklio savybės turi būti žinomos, jas reikėtų išbandyti atskiroje kontrolinėje grupėje, kurioje naudojamas tik tirpiklis. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra laikoma stabilia, tam, kad ji lengviau tirptų, galima ją lengvai pakaitinti, greitai mechaniškai pamaišyti. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą nešiklyje. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga per visą tyrimą išlieka stabili, galima parengti vieną pradinę alikvotinę bandomosios cheminės medžiagos dalį ir kasdien ją skiesti nustatytais dozėmis.

39. Dozavimo trukmė priklausys nuo taikomo modelio (26 punkte aptartas nesubrendusių gyvūnų modelis, 30 punkte – OVX suaugusių gyvūnų modelis). Nesubrendusioms žiurkių patelėms bandomosios cheminės medžiagos dozės duodamos kasdien tris dienas iš eilės. Dozės duoti tris dienas rekomenduojama ir žiurkių patelėms, kurioms atlikta ovariectomija, bet ilgesnis dozių davimas yra galimas ir gali pagerinti silpnų cheminių medžiagų nustatymo rezultatus. Jei naudojamos pelių patelės, kurioms atlikta ovariectomija, turėtų pakakti dozės duoti tris dienas; kai naudojami stiprūs estrogenų agonistai, šio laikotarpio pratęsimas iki septynių dienų pastebimai didesnės naudos neduoda, tačiau per tinkamumo patvirtinimo tyrimą (16) toks ryšys su silpnais estrogenais nenustatytas, taigi suaugusioms pelėms, kurioms atlikta ovariectomija, dozių davimo laikotarpį galima pratęsti iki 7 dienų iš eilės. Dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku. Prireikus dozės reikėtų tikslinti, kad būtų išlaikytas pastovus dozės dydis pagal santykį su gyvūno kūno mase (pvz., bandomosios cheminės medžiagos miligramai vienam kūno masės kilogramui per dieną). Kalbant apie bandomosios medžiagos kiekį, reikėtų užtikrinti, kad pagal santykį su kūno mase jis kuo mažiau keistųsi, – tikslinti dozės tirpalo koncentraciją taip, kad visais dozės lygmenimis ir naudojant visus dozės davimo būdus būtų užtikrintas pastovus bandomosios cheminės medžiagos kiekis pagal santykį su kūno mase.
40. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, gyvūnams per vieną dieną turėtų būti duodama tik viena dozė naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Didžiausias gyvūnui vienu metu duodamo skysčio kiekis priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Reikėtų laikytis vietos gyvūnų priežiūros taisyklių, tačiau šis kiekis neturėtų būti didesnis kaip 5 ml/kg kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 10 ml/kg kūno masės.
41. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama poodinėmis injekcijomis, jos turėtų būti suleidžiamos viena paros dozė. Dozės turėtų būti leidžiamos mentikaulio arba strėnų srityje sterilia adata (pvz., 23 arba 25 dydžio) ir tuberkulino švirkštu. Injekcijos vietos nuskusti nebūtina. Jei dozė prarandama, injekcijos vietoje prateka arba suduodama ne visa, tai reikėtų užrašyti. Vienai žiurkei per parą reikėtų suleisti ne daugiau kaip 5 ml/kg kūno masės injekcijos, injekciją padalijus ir suleidus dviejose vietose, išskyrus tuos atvejus, kai naudojami vandeniniai tirpalai ir galima leisti 10 ml/kg kūno masės injekcijas.

Stebėjimai

Bendri ir klinikiniai stebėjimai

42. Bendrus klinikinius stebėjimus reikėtų atlikti bent kartą per dieną ir dažniau, jei pastebima toksiškumo požymių. Stebėjimus geriausia atlikti tuo pačiu metu, kiekvieną dieną, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio po dozės davymo laiką. Reikėtų visus gyvūnus tikrinti, ar nenugaišo, ar negaišta, vertinti bendrus klinikinius požymius, pavyzdžiui, elgsenos, odos, kailio, akių, gleivinės pakitimus, sekreto ir ekskrecijų dažnį, autonominę aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžio dydį, neįprastą kvėpavimą).

Kūno masė ir pašaro suvartojimas

43. Visus gyvūnus reikėtų kasdien pasverti 0,1 g tikslumu, pradedant sverti prieš pat tyrimo pradžią, t. y. kai gyvūnai suskirstomi į grupes. Kitas būdas – galima matuoti per tyrimą kiekvieno narvelio gyvūnų suvartojamo pašaro kiekį sveriant šėrimo įrenginį. Pašaro suvartojimo rezultatus reikėtų išreikšti gramais vienai žiurkei per dieną.

Skrodimas ir gimdos masės matavimas

44. Praėjus dvidešimt keturioms valandoms po paskutinės dozės davimo žiurkės humaniškai numarinamos. Idealiu atveju nekroskopija atliekama gyvūnus imant atsitiktine tvarka iš įvairių grupių, siekiant išvengti tiesioginės didėjančios ar mažėjančios progresijos kurioje nors dozės grupėje, nes tai galėtų šiek tiek paveikti duomenis. Bioanalizės tikslas – išmatuoti ir dar drėgnos gimdos, ir nusausintos gimdos masę. Dar drėgno organo masę sudaro gimda ir luminalinis skystis. Nusausinto organo masę matuojama iš gimdos nuspaudus ir pašalinus luminalinį turinį.

45. Jei skrodžiami nesubrendę gyvūnai, prieš skrodimą apžiūrima, kokia yra makšties atsivėrimo būklė. Skrodimas pradedamas atveriant pilvo sienelę nuo gaktos simfizio. Paskui nuo dorsalinės pilvo sienelės atskiriami gimdos ragai ir kiaušidės, jei jos yra. Nuo ventralinės ir lateralinės gimdos ir makšties pusės atskiriama šlapimo pūslė ir šlapimtakiai. Skaidulinės sąaugos tarp tiesiosios žarnos ir makšties yra atskiriamos, kol bus matoma makšties angos susijungimo su tarpvietės oda vieta. Gimda ir makštis atskiriamos nuo kūno įpjauant makšties sienelę iš karto virš susijungimo su tarpvietės oda vietos, kaip parodyta 2 pvz., Gimdą reikėtų atskirti nuo kūno sienelės atsargiai nupjauant gimdos pasaitus jų prisijungimo taškuose per visą kiekvieno gimdos rago dorsolateralinį ilgį. Išimtą iš kūno gimdą reikėtų pakankamai greitai sutvarkyti, kad audiniai neišdžiūtų. Masės praradimas dėl išdžiuvimo tampa dar svarbesnis, kai dirbama su smulkiais audiniais, tokiais kaip gimdos (23). Jeigu yra kiaušidės, jos atskiriamos prie kiaušintakių stengiantis, kad iš gimdos rago neištekėtų luminalinis skystis. Jeigu gyvūnui buvo atlikta ovariektomija, reikėtų patikrinti, ar kiaušidžių pašalinimo vietoje nėra kiaušidžių audinio likučių. Nupjauamas perteklinis riebalinis sluoksnis ir jungiamieji audiniai. Makštis išpjauama iš gimdos po gimdos kakleliu taip, kad gimdos kaklelis liktų prie gimdos kūno, kaip parodyta 2 pav.
46. Kiekvieną gimdą reikėtų įdėti į unikalia žyma pažymėtą ir pasvertą indą (pvz., petri lėkštelę arba plastikinę svėrimo vonelę) ir toliau stengiantis, kad iki svėrimo audiniai neišdžiūtų (pvz., į indą galima padėti fiziologiniu skysčiu šiek tiek sudrėkintą filtravimo popierių). Gimda su liminaliniu skysčiu sverama 0,1 mg tikslumu (dar drėgnos gimdos masė).
47. Kiekviena gimda paskui ruošama atskirai – pašalinamas luminalinis skystis. Abu gimdos ragai praduriami arba perpjaunami išilgai. Gimda padedama ant šiek tiek sudrėkinto filtravimo popieriaus (pvz., vatmano Nr. 3) ir lengviau prispaudžiama antru šiek tiek sudrėkintu filtravimo popieriaus lakštu, kad luminalinis skystis visiškai pasišalintų. Gimda be luminalinio skysčio pasverama 0,1 mg tikslumu (nusaustos gimdos masė).
48. Gimdos masės duomenis tyrimo pabaigoje galima panaudoti užtikrinimui, kad nebūtų viršytas atitinkamas nesubrendusių ir neporuotų žiurkių amžius, bet šiuo aspektu lemiamą reikšmę turi ankstesni duomenys apie laboratorijos naudojamą žiurkių veislę (dėl rezultatų aiškinimo žr. 56 punktą).

Neprivalomi tyrimai

49. Pasvertą gimdą galima dėti į 10 % neutralų buferinį formaliną, kad vėliau nudažius hematoksilino ir eozino (HE) dažais būtų galima atlikti histopatologinius tyrimus. Makštį galima atitinkamai tirti (žr. 9 punktą). Kiekybinių palyginimų tikslais dar galima atlikti morfometrinius endometrinio epitelio matavimus.

DUOMENYS IR ATASKAITA

Duomenys

50. Tyrimo duomenis turėtų sudaryti ši informacija:
- gyvūnų skaičius analizės pradžioje;
 - gyvūnų, kurie atliekant analizę nugaišo arba dėl humaniškų priežasčių buvo numarinti, skaičius, identifikavimo duomenys, nugaišimo arba humaniško numarino data ir laikas;
 - gyvūnų, kuriems pasireiškė toksiškas poveikis, skaičius, identifikavimo duomenys ir pastebėtų toksiškumo požymių apibūdinimas, įskaitant duomenis apie kiekvieno toksiškumo požymio pasireiškimo pradžią, trukmę, stiprumą; ir
 - gyvūnų, kuriems pasireiškė kokio nors pobūdžio pažeidimai, skaičius, identifikavimo duomenys ir pažeidimo apibūdinimas.
51. Reikėtų užrašyti kiekvieno gyvūno kūno masę, dar drėgnos gimdos ir nusaustos gimdos masę. Norint nustatyti, ar bandomosios cheminės medžiagos vartojimas sukėlė statistiškai reikšmingą ($p < 0,05$) gimdos masės didėjimą, reikėtų taikyti vienpusę statistinę agonistų analizę. Reikėtų atlikti atitinkamą statistinę analizę ir nustatyti, kokių su dozių vartojimu susijusių pokyčių įvyko, vertinant dar drėgnos ir nusaustos gimdos masę. Pavyzdžiui, duomenis galima vertinti taikant kovariacinės analizės (ANCOVA) metodą, nes kūno masė nekroscopijos metu yra kovarijuojantis dydis. Prieš analizuojant duomenis galima atlikti gimdos duomenų variacijas stabilizuojančią logaritminę transformaciją. Kiekvienos dozės grupės ir neišklio kontrolinės grupės duomenų poroms prasmingai palyginti ir patikimumo intervalams apskaičiuoti galima taikyti Dunett ir Hsu metodą. Galimoms išskirtims nustatyti ir

variacijų homogeniškumui įvertinti galima naudoti studentizuotas netikčių diagramas. Šios procedūros buvo taikomos EBPO tinkamumo patvirtinimo programoje, statistinės analizės sistemoje buvo naudojama PROC GLM procedūra (SAS Institute, Cary, NC) (8 versija) (6) (7).

52. Gautinėje ataskaitoje pateikiama ši informacija:

Bandymą atliekanti įstaiga:

- atsakingi darbuotojai ir jų pareigos atliekant tyrimą;
- bazinio teigiamo kontrolinio bandymo duomenys ir periodinės teigiamos kontrolės duomenys (žr. 26 ir 27 punktus).

Bandomoji cheminė medžiaga:

- bandomųjų cheminių medžiagų apibūdinimas;
- fizikinė būsena ir, jei reikia, fizikinės ir cheminės savybės;
- skiedimo metodas ir periodiškumas;
- visi surinkti duomenys apie stabilumą;
- visų dozavimo sprendimų analizė.

Nešiklis:

- bandomojo nešiklio apibūdinimas (pobūdis, tiekėjas ir partija);
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas (jei nešiklis ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai:

- rūšis, veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;
- tiekėjas ir konkreti tiekėjo įranga;
- amžius, pritaikymas ir atsivedimo data;
- jei gyvūnai yra nesubrendę, – ar pristatyti kartu su motinine arba kita žindančia patele ir nujunkymo data;
- gyvūnų aklimatizacijos procedūros duomenys;
- viename narvelyje laikomų gyvūnų skaičius;
- kiekvieno gyvūno ir gyvūnų grupės identifikavimo duomenys ir ženklavimo metodas.

Analizės sąlygos:

- duomenys apie atsitiktinės atrankos eigą (t. y. taikytas metodas);
- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;
- duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos sudėtį, gautą koncentraciją, stabilumą ir vienalytiškumą;
- išsamūs duomenys apie tai, kaip bandomoji cheminė medžiaga duodama, ir pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą;
- pašarai (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis ir, jei žinoma, fitoestrogenų kiekis);
- vandens šaltinis (pvz., vandentiekio ar filtruotas vanduo) ir tiekimas (vamzdeliais iš didelio konteinerio, buteliais ir t. t.);
- kraikas (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis);
- duomenys apie laikymo narvelyje sąlygas, apšvietimo intervalus, patalpos temperatūrą ir drėgmę, patalpos valymą;
- išsamus nekroskopijos ir gimdos svėrimo procedūrų aprašas;
- statistinių procedūrų aprašas.

*Rezultatai**Apie kiekvieną gyvūną:*

- visi kasdieniai kiekvieno gyvūno kūno masės rodikliai (nuo suskirstymo į grupes iki nekroskopijos (0,1 g tikslumu);
- kiekvieno gyvūno amžius (dienomis, skaičiuojant nuo atsivedimo dienos, kuri laikoma 0 diena), kada pradėdama duoti bandomosios cheminės medžiagos;
- kiekvienos dozės davimo data ir laikas;
- apskaičiuotas kiekis ir duodama dozė, pastabos, ar duodant arba po davimo dozė nebuvo prarasta;
- kasdienis gyvūno būsenos registravimas, įskaitant svarbius simptomus ir pastebėtus dalykus;
- įtariama nugaišimo priežastis (jeigu per tyrimą gyvūnas randamas gaištantis arba nugaišęs);
- humaniško numarinimo data ir laikas ir laiko intervalas nuo paskutinės dozės davimo;
- dar drėgnos gimdos masė (0,1 mg tikslumu) ir pastabos dėl luminalinio skysčio praradimo per skrodimą ir paruošimą sverti;
- nusausintos gimdos masė (0,1 mg tikslumu).

Apie kiekvieną gyvūnų grupę:

- dienos kūno masės vidurkis (0,1 g tikslumu) ir standartiniai nuokrypiai (nuo suskirstymo į grupes iki nekroskopijos);
- dar drėgnos gimdos masės vidurkis ir nusausintos gimdos masės vidurkis (0,1 mg tikslumu) bei standartiniai nuokrypiai;
- pašaro suvartojimas per dieną, jei matuojama (skaičiuojamas vieno gyvūno suvartoto pašaro kiekis gramais);
- statistinės analizės rezultatai lyginant dozes gaunančių grupių gyvūnų dar drėgnos ir nusausintos gimdos masės rodiklius su tais pačiais nešiklio kontrolinių grupių gyvūnų rodikliais;
- statistinės analizės rezultatai lyginant dozes gaunančių grupių gyvūnų kūno masę ir kūno masės prieaugį su tais pačiais nešiklio kontrolinių grupių gyvūnų rodikliais.

53. Svarbių pagal bandymų metodą rekomenduojamų aspektų santrauka

	Žiurkės	Pelės
Gyvūnai		
Veislė	Dažniausiai naudojama laboratorinių graužikų veislė	
Gyvūnų skaičius	Ne mažiau kaip po 6 gyvūnus vienoje dozės grupėje	
Grupių skaičius	Ne mažiau kaip 2 bandymo grupės (paaiškinimai pateikti 33 punkte) ir neigiamos kontrolės grupė Paaiškinimai dėl teigiamos kontrolės grupių pateikti 26 ir 27 punktuose	
Laikymo ir šėrimo sąlygos		
Gyvūnų patalpos temperatūra	22 °C ± 3 °C	
Santykinė drėgmė	50–60 %, ne mažesnė kaip 30 % ir ne didesnė kaip 70 %	
Apšvietimo seka per parą	12 h šviesos, 12 h tamsos	
Pašaras ir geriamasis vanduo	Ad libitum	

	Žiurkės	Pelės
Laikymas	Atskirai arba grupėmis ne daugiau kaip po tris gyvūnus (nesubrendusius gyvūnus rekomenduojama laikyti socialinėmis grupėmis)	
Pašaras ir kraikas	Rekomenduojama užtikrinti, kad naudojamuose pašaruose ir kraike būtų mažai fitoestrogenų	
Protokolas		
Metodas	Metodas, kai naudojamos nesubrendusios patelės, kurioms neatlikta ovariectomija (šiam metodui teikiama pirmenybė) Metodas, kai naudojamos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariectomija	Metodas, kai naudojamos suaugusios patelės, kurioms atlikta ovariectomija
Nesubrendusių gyvūnų amžius, nuo kurio pradama duoti dozės	Ne anksčiau kaip 18 PND. Dozės reikėtų baigti duoti iki 25 PND	Šiam bandymų metodui neaktualu
Amžius, kada atliekama ovariectomija	6–8 amžiaus savaitę	
Gyvūnų, kuriems atlikta ovariectomija, amžius, nuo kurio pradama duoti dozės	Nuo ovariectomijos iki pirmos dozės davimo turi praeiti ne mažiau kaip 14 dienų	Nuo ovariectomijos iki pirmos dozės davimo turi praeiti ne mažiau kaip 7 dienos
Kūno masė	Kūno masės variacija turėtų būti minimali, ne didesnė kaip ± 20 % vidutinės masės	
Dozavimas		
Davimo būdas	Per virškinamąjį traktą naudojant zondą arba poodinės injekcijos	
Davimo periodiškumas	Viena dozė per dieną	
Kiekis duodant per zondą ir su injekcija	≤ 5ml/kg kūno masės (arba iki 10 ml/kg kūno masės, kai duodami vandeniniai tirpalai) (jei daromos injekcijos, 2 injekcijos vietos)	
Davimo trukmė	3 dienos iš eilės, kai taikomas nesubrendusių gyvūnų modelis Ne trumpiau kaip 3 dienos iš eilės, kai taikomas OVX gyvūnų modelis	7 dienos iš eilės, kai taikomas OVX gyvūnų modelis
Nekroskopijos laikas	Praėjus apie 24 h nuo paskutinės dozės	
Rezultatai		
Teigiamas atsakas	Statistiškai reikšmingas gimdos (dar drėgnos ir (arba) nusaustos) masės vidurkio padidėjimas	
Etaloninis estrogenas	17α-etinilestradiolis	

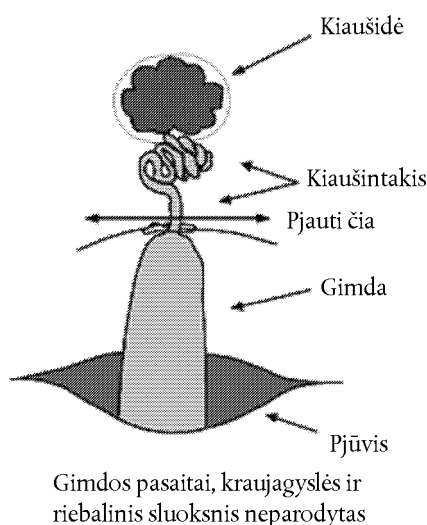
REKOMENDACIJOS DĖL REZULTATŲ AIŠKINIMO IR PRIĖMIMO

54. Apskritai estrogeninio poveikio bandymą reikėtų laikyti teigiamu, jeigu gimdos masės padidėjimas yra statistiškai reikšmingas ($p < 0,05$) bent jau didelės dozės lygmeniu, palyginti su tirpalo kontroline grupe. Teigiamas rezultatas dar patvirtinamas pademonstruojant biologiškai galimą ryšį tarp dozės ir atsako stiprumo, turint omenyje, kad vienu metu pasireiškiantis estrogeninis ir antiestrogeninis bandomosios cheminės medžiagos poveikis gali turėti įtakos reakcijos į dozę kreivės formai.
55. Kad gautus duomenis būtų galima prasmingai aiškinti, reikėtų stengtis neviršyti maksimalios toleruojamos dozės. Kūnos masės sumažėjimą, klinikinius požymius ir kitus gautus duomenis reikėtų šiuo požiūriu kruopščiai įvertinti.

56. Svarbus poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės duomenų priėmimo kriterijus yra nešiklio kontrolinės grupės gyvūnų gimdos masė. Didelės kontrolinės vertės gali kelti abejonių dėl bioanalizės jautrumo ir gebėjimo nustatyti labai silpnus estrogenų agonistus. Peržvelgus literatūros šaltinius ir duomenis, gautus tvirtinant poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės tinkamumą, matyti, kad dideli kontrolinių verčių vidurkiai tikrai atsiranda spontaniškai, ypač kai naudojami nesubrendę gyvūnai (2) (3) (6) (9). Nesubrendusių žiurkių gimdos masė priklauso nuo daugelio kintamųjų, pavyzdžiui, veislės arba kūno masės, galutinės aukščiausios gimdos masės ribos nurodyti neįmanoma. Pavyzdžiui, jeigu kontrolinės grupės nesubrendusių žiurkių nusaustos gimdos masė yra 40–45 mg, rezultatus reikėtų vertinti kaip įtartinus, o jei gimdos masė yra didesnė negu 45 mg, bandymą gali tekti pakartoti. Tačiau tai kiekvienu atveju reikia vertinti atskirai (3) (6) (8). Kai bandymai atliekami su suaugusiomis žiurkėmis, ne iki galo atlikus ovariectomiją paliekama kiaušidžių audinio, kuris gali gaminti endogeninius estrogenus ir stabdyti gimdos masės regresiją.
57. Jeigu nešiklio kontrolinės grupės gyvūnų nusaustos gimdos masė sudaro: nesubrendusių žiurkių patelių – mažiau negu 0,09 % kūno masės, jaunų suaugusių patelių, kurioms atlikta ovariectomija, – 0,04 % [žr. 31 lentelę (2)], tada tikėtina, kad rezultatai yra priimtini. Jeigu kontrolinės gimdos masės vertės yra didesnės už šias reikšmes, reikėtų nuodugniai patikrinti įvairius veiksnus, tarp jų – gyvūnų amžių, ar tinkamai atlikta ovariectomija, fitoestrogenų kiekį pašaruose ir t. t.; neigiamus tyrimo rezultatus (estrogeninio veikimo požymių nenustatoma) reikėtų vertinti labai atsargiai.
58. Anksčiau surinktus nešiklio kontrolinių grupių duomenis reikėtų saugoti laboratorijoje. Anksčiau surinktus duomenis apie atsaką į teigiamus etaloninius estrogenus, pavyzdžiui, 17a-etinilestradiolį, taip pat reikėtų saugoti laboratorijoje. Laboratorijos taip pat gali išbandyti atsaką į žinomus silpnus estrogenų agonistus. Visus šiuos duomenis galima palyginti su turimais duomenimis (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8), kad būtų užtikrinta, jog pagal laboratorijos metodus atliekami tyrimai yra pakankamai jautrūs.
59. Per EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimą nusaustos gimdos masės duomenų variacijos buvo mažesnės, palyginti su dar drėgnos gimdos masės duomenimis (6) (7). Tačiau reikšmingas bet kurio iš šių matų atsakas rodytų, kad bandomoji cheminė medžiaga tikrai daro estrogeninį poveikį.
60. Poveikį gimdai turintis atsakas būna ne vien estrogeninės kilmės, tačiau teigiamus poveikiu gimdai pagrįstos bioanalizės rezultatus paprastai reikėtų aiškinti kaip galimo estrogeninio poveikio *in vivo* įrodymą ir imtis tolesnio aiškinimosi tyrimų (žr. 9 punktą ir EBPO Konceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (2 priedas)).

1 pvz.

Chirurginio kiaušidžių pašalinimo schema

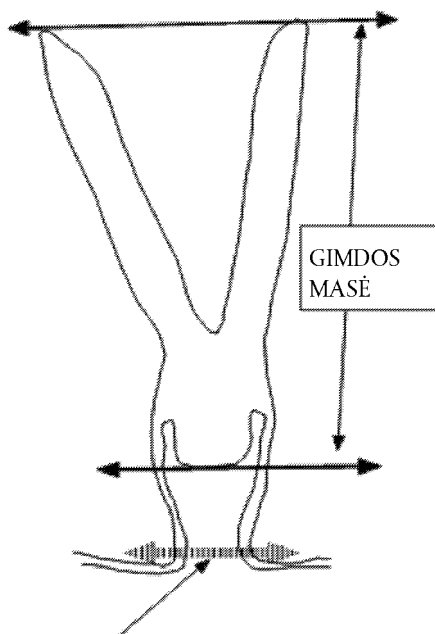


Procedūra pradedama atveriant dorsolateralinę pilvo sienelę per vidurį tarp šonkaulių krašto ir kryžkaulio, per kelis milimetrus į šoną link lateralinės strėnų raumens ribos. Pilvo ertmėje surandamos kiaušidės. Kiaušidės fiziškai

išimamos iš pilvo ertmės ant sterilaus paviršiaus, tarp kiaušidės ir gimdos dedama ligatūra kraujavimui sustabdyti, kiaušidės atskiriamos pjūviu virš ligatūros kiaušintakių ir kiekvieno gimdos rago susijungimo vietose. Įsitikinus, kad nėra didelio kraujavimo, pilvo sienelę reikėtų susiūti, odą sukabinti chirurginėmis kabėmis arba atitinkamai susiūti. Iki naudojimo bandyme reikėtų palaukti bent 14 dienų, kol gyvūnai atsigaus ir gimdos masė regresuos.

2 pvz.

Gimdos audinių išėmimas ir parengimas masės matavimui



Atskyrimo linija atliekant nekroskopiją

Procedūra pradedama atveriant pilvo sienelę prie gaktos simfizio. Paskui nuo dorsalinės pilvo sienelės atskiriama kiekviena kiaušidė, jei yra, ir gimdos ragai. Nuo pilvinės ir lateralinės gimdos ir makšties pusės atskiriama šlapimo pūslė ir šlapimtakiai. Skaidulinės sąaugos tarp tiesiosios žarnos ir makšties yra atskiriamos taip, kad būtų galima matyti makšties angos ir tarpvietės odos susijungimo vietą. Gimda ir makštis atskiriamos nuo kūno įpjauant makšties sienelę iš karto virš susijungimo su tarpvietės oda vietos, kaip parodyta 2 pvz., Gimdą reikėtų atskirti nuo kūno sienelės atsargiai nupjaunant gimdos pasaitus jų prisijungimo taškuose per visą kiekvieno gimdos rago dorsolateralinį ilgį. Išėmus iš kūno nupjaunami perteklinis riebalinis sluoksnis ir jungiamasis audinys. Jeigu kiaušidės yra, jos atskiriamos prie kiaušintakių, stengiantis, kad iš gimdos rago neištekėtų luminalinis skystis. Jeigu gyvūnui buvo atlikta ovariektomija, reikėtų patikrinti, ar kiaušidžių pašalinimo vietoje nėra kiaušidžių audinio likučių. Makštis atskiriama nuo gimdos po gimdos kakleliu, kad gimdos kaklelis liktų prie gimdos kūno, kaip parodyta 2 pvz., Paskui gimdą galima pasverti.

1 priedėlis

SĄVOKOS

Antiestrogeninis poveikis – tai cheminės medžiagos savybė stabdyti 17β estradiolio veikimą žinduolių organizme.

Cheminė medžiaga – tai medžiaga arba mišinys.

Atsivedimo data – yra 0 postnatalinė diena.

Dozavimas – bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozės davimo trukmę.

Dozė – duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Atliekant poveikiu gimdai pagrįstą bioanalizę dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase bandomojo gyvūno masės vienetui per dieną (pvz., mg/kg kūno masės/per dieną).

Maksimali toleruojama dozė (MTD) – didžiausias cheminės medžiagos kiekis, kuriam patekus į bandomųjų gyvūnų organizmą gyvūnai nenugaišta (žymima LD₀) (IUPAC, 1993).

Estrogeninis poveikis – tai cheminės medžiagos savybė žinduolių organizmą veikti kaip 17β estradiolis.

X postnatalinė diena – X-oji diena nuo atsivedimo.

Jautrumas – visų teigiamų/veiklių cheminių medžiagų, kurios yra teisingai suklasifikuojamos pagal bandymo rezultatus, dalis. Tai bandymų metodo, kurį taikant gaunami kategoriški rezultatai, tikslumo matas, kuris yra svarbus kriterijus vertinant bandymų metodo tinkamumą.

Specifiškumas – visų neigiamų/neveiklių cheminių medžiagų, kurios yra teisingai suklasifikuojamos pagal bandymo rezultatus, dalis. Tai bandymų metodo, kurį taikant gaunami kategoriški rezultatai, tikslumo matas, kuris yra svarbus kriterijus vertinant bandymų metodo tinkamumą.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Turintis poveikį gimdai – sąvoka vartojama teigiamam poveikiui gimdos audinių augimui apibūdinti.

Tinkamumo patvirtinimas – mokslinis procesas, kurio paskirtis – aprašyti darbo reikalavimus ir bandymų metodo apribojimus siekiant parodyti metodo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

Pastaba. Šį dokumentą parengė Bandymų gairių programos sekretoriatas pagal 6-ajame EDTA darbo grupės posėdyje sudarytą susitarimą

EBPO konceptuali endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistema

1 lygmuo Suskirstymas ir prioritetų nustatymas pagal turimą informaciją	— Fizikinės ir cheminės savybės, pvz., molekulinė masė, reaktyvumas, lakumas, biologinis skaidumas — Poveikio žmogui ir gamtai būdai, pvz., gamybos mastas, išleidimas, naudojimo modeliai — Pavojingumas, pvz., turimi toksikologiniai duomenys
2 lygmuo <i>In vitro</i> assays analizės mechanistiniams duomenims surinkti	— RišimosioprieER, AR, TR receptorių afiniškumas — Transkripcijos aktyvinimas — Aromatazė ir steroidogenezė <i>in vitro</i> — Arilo angliavandenilio receptoriaus atpažinimas/rišimasis — QSAR — Parengiamoji didelio pralaidumo atranka — Skydliaukės funkcija — Žuvų hepatocitų VTG analizė — Kita (pagal poreikį)
3 lygmuo <i>In vivo</i> analizės duomenims apie vieną endokrininės sistemos mechanizmą ir apie poveikį surinkti	— Poveikiu gimdai pagrįsta analizė (susijusi su estrogenais) — Hershberger'io analizė (susijusi su androgenais) — Nereceptorinė hormonų funkcija — Kita (pvz. skydliaukė) — ŽuvųVTG (vitelogenino) analizė (susijusi su estrogenais)
4 lygmuo <i>In vivo</i> analizės duomenims apie keletą endokrininės sistemos mechanizmų ir apie poveikį surinkti	— Patobulintos EBPO gairės Nr.407 (vertinamosios baigtys, grindžiamos endokrininės sistemos mechanizmais) — Patinėlių ir patelių lytinio subrendimo analizė — Suaugusių nekastruotų patinėlių analizė — Žuvų lytinių liaukų histopatologijos analizė — Varlių metamorfozės analizė
5 lygmuo <i>In vivo</i> analizės duomenims apie keleto endokrininės sistemos ir kitų mechanizmų poveikį surinkti	— 1 kartos analizė (patobulintos TG 415)¹ — 2 kartų analizė (patobulintos TG 416)¹ — Dauginimosi atrankos bandymas (patobulintos TG 421)¹ — Jungtinis 28 dienų/dauginimosi atrankos bandymas (patobulintos TG 422)¹ — Žuvų, paukščių, amfibijų ir bestuburių gyvūnų analizė, atliekama per dalį gyvenimo ciklo arba visą ciklą (vystymosi ir dauginimosi analizė) ¹ Galimus patobulinius svarstys VMG-mamm

VMG-mamm: Bandymų su žinduoliais ir žinduolių vertinimo tinkamumo patvirtinimo valdymo grupė (angl. *Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment*)

PASTABOS DĖL KONCEPTUALIOS SISTEMOS

- 1 pastaba. Prisijungti prie tyrimo ir pasitraukti iš tyrimo galima visais lygmenimis; tai priklauso nuo esamų informacijos poreikių pavojaus ir rizikos vertinimo tikslais.
- 2 pastaba. 5 lygmeniu ekotoksikologija turėtų apimti vertinamąsias baigtis, kuriomis žymimi žalingo poveikio mechanizmai ir galima žala populiacijai.
- 3 pastaba. Kai daugialypis modelis apima keleto atskirų vertinamųjų baigčių tyrimą, tas modelis būtų taikomas vietoj pavienių vertinamųjų baigčių analizės.
- 4 pastaba. Kiekviena cheminė medžiaga turėtų būti vertinama kiekvienu atveju atskirai, atsižvelgiant į visą turimą informaciją ir konceptualios sistemos lygmenis.
- 5 pastaba. Kol kas šis planas apima ne viską. 3, 4 ir 5 lygmenyse jis apima analizę, kurią vykdyti jau galima arba kurios tinkamumas dar tvirtinamas. Antrosios grupės analizė įtraukta preliminariai. Kai ji bus išplėta ir patvirtinta, ja planas bus oficialiai papildytas.
- 6 pastaba. Nereikėtų suprasti, kad 5 lygmuo apima tik baigiamuosius bandymus. Šiuo lygmeniu įtraukiami bandymai laikomi padešančiais įvertinti bendrą pavojingumą ir riziką.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 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 [¹²⁵I]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 17 β -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 ovarian 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) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos. OL L 276, 2010 10 20, p. 33).

B.55. ŽIURKIŲ *HERSHBERGER* BIOANALIZĖ: TRUMPALAIKĖ (ANTI)ANDROGENINIŲ SAVYBIŲ ATRANKOS ANALIZĖ

IVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. OECD *Test Guideline* (TG)) Nr. 441 (2009). 1998 m. EBPO iniciatyva pradėtas didelės svarbos darbas – peržiūrėti esamas gaires ir parengti naujas endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos ir bandymų gaires. Viena iš šio darbo dalių – parengti žiurkių *Hershberger* bioanalizės gaires. Ši analizė farmacijos pramonėje taikoma jau keletą dešimtmečių, o oficialaus ekspertų komiteto pirmą kartą buvo standartizuota 1962 m. kaip androgeninių cheminių medžiagų atrankos priemonė (2). 2001–2007 m. įvykdyta plati žiurkių *Hershberger* bioanalizės tinkamumo patvirtinimo programa, per kurią parengtas aiškinamosios informacijos dokumentas (23), išsamios informacijos apie metodus rinkinys (3), skrodimo vadovas (21), atlikti platūs tyrimai vienoje laboratorijoje ir skirtingose laboratorijose, kuriais siekta įrodyti bioanalizės patikimumą ir atkuriamumą. Šie tinkamumo patvirtinimo tyrimai buvo atlikti su stipriu etaloniniu androgenu (testosterono propionatu (TP)), dviem stipriais sintetiniais androgenais (trenbolono acetatu ir metiltestosteronu), stipriu antiandrogeniniu vaistu (flutamidu), stipriu natūralaus androgeno (dihidrotestosterono – DHT) sintezės inhibitoriumi (finasteridu), keliais silpnais antiandrogeniniais pesticidais (linuronu, vinklozolinu, procimdonu, p,p' DDE), stipriu 5α reduktazės inhibitoriumi (finasteridu) ir dviem žinomomis neigiamomis cheminėmis medžiagomis (dinitrofenoliu ir nonilfenoliu) (4) (5) (6) (7) (8). Šis bandymų metodas yra paremtas ilgamete ankstesnio bioanalizės taikymo patirtimi, patirtimi, įgyta įgyvendinant bandymo tinkamumo patvirtinimo programą, taip pat ją įgyvendinant gautais rezultatais.
2. *Hershberger* bioanalizė yra trumpalaikis *in vivo* atrankos bandymas, kuriame naudojami pagalbiniai patinėlių dauginimosi sistemos audiniai. Analizė sukurta 4-ajame dešimtmetyje, 5-ajame dešimtmetyje ji buvo pakeista – į ją įtraukti į androgenus reaguojantys patinėlių dauginimosi sistemos raumenys (2) (9–15). 7-ajame dešimtmetyje remiantis standartizuota protokolo versija (2) (14) buvo įvertinta daugiau kaip 700 galimų androgenų; 7-ajame dešimtmetyje ši analizė buvo laikoma standartiniu ir androgenų, ir antiandrogenų tyrimo metodu (2) (15). Ši bioanalizė grindžiama penkių nuo androgenų priklausomų audinių masės pokyčiais tiriant lytinės brandos amžiaus kastruotus žiurkių patinėlius. Ją atliekant vertinamas cheminės medžiagos gebėjimas paskatinti androgenų agonistų, antagonistų arba 5α-reduktazės inhibitorių veikimą atitinkantį biologinį aktyvumą. Į šį bandymų metodą įtraukti penki tiksliniai nuo androgenų priklausomi audiniai: ventralinė prostatos skiltis (angl. VP), sėklinės pūslelės (angl. SV) (taip pat skysčiai ir koaguliacijos liaukos), išangės pakeliamasis ir stormeninis akytkūnio (angl. LABC) raumuo, abi Kuperio liaukos (angl. COW) ir varpos galva (angl. GP). Tiriant lytinės brandos amžiaus kastruotus žiurkių patinėlius, visi šie penki audiniai reaguoja į androgenus – jų absoliuti masė padidėja. Kai tie patys audiniai stimuliuojami duodant stipraus etaloninio androgeno, kad jų masė padidėtų, davus antiandrogeno visi šie penki audiniai sureaguoja ir jų absoliuti masė sumažėja. Pagal pradinį *Hershberger* bioanalizės modelį buvo numatyta naudoti chirurgiškai kastruotus lytinės brandos amžiaus patinėlius, šis modelis patvirtintas *Hershberger* tinkamumo patvirtinimo programos 1, 2 ir 3 etapais.
3. *Hershberger* bioanalizė yra mechanistinė *in vivo* androgenų agonistų, androgenų antagonistų ir 5α-reduktazės inhibitorių atrankos analizė; jos taikymą reikėtų vertinti pagal EBPO conceptualią endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistemą (2 priedėlis). Pagal šią conceptualią sistemą *Hershberger* bioanalizė yra 3 lygmens *in vivo* analizė, kurią atliekant gaunama duomenų apie vieną endokrininės sistemos mechanizmą, t. y. (anti)androgeninį poveikį. Ši bioanalizė sukurta kaip *in vitro* ir *in vivo* bandymų serijos dalis ir yra skirta cheminėms medžiagoms, kurios gali sąveikauti su endokrine sistema, nustatyti ir taip padėti atlikti pavojingumo ir rizikos žmogaus sveikatai ir aplinkai vertinimą.

4. Kadangi kastravimo procedūra kelia su gyvūnų gerove susijusių abejonių, kaip alternatyvą *Hershberger* bioanalizei bandyta naudoti stimuliuojamus neoperuotus (nekastruotus) nujunkytus patinėlius ir taip išvengti kastracijos etapo. Bandymo su stimuliuojamais nujunkytais gyvūnais metodo tinkamumas buvo patvirtintas (24); tačiau atliekant *Hershberger* bioanalizės modelio, pagal kurį naudojami nujunkyti gyvūnai, tinkamumo patvirtinimo tyrimus, bandomo dydžio silpnų antiandrogenų dozių poveikį nuo androgenų priklausomų organų masei pavyko nustatyti ne visais atvejais. Todėl šis modelis į šį bandymų metodą neįtrauktas. Tačiau pripažįstant, kad šis modelis ne tik gali būti naudingas saugant gyvūnų gerovę, bet ir suteikti informacijos apie kitus veikimo būdus, jis yra aprašytas EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 115 (25).

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

5. Androgenų agonistai ir antagonistai veikia kaip androgenų receptorių ligandai ir gali atitinkamai aktyvinti arba slopinti receptoriaus kontroliuojamą genų transkripciją. Be to, kai kurios cheminės medžiagos, kai kuriuose androgenų veikiamuose audiniuose slopina testosterono virtimą stipresniu natūraliu androgenu dihidrotestosteronu (5 α -reduktazės inhibitoriai). Tokios cheminės medžiagos gali kelti pavojų sveikatai, įskaitant poveikį reprodukcijai ir vystymuisi. Dėl to reguliavimo tikslais cheminę medžiagą reikia greitai įvertinti ir nustatyti, ar ji gali veikti kaip androgeno agonistas, antagonistas arba 5 α -reduktazės inhibitorius. Nors ligandų rišimosi prie androgenų receptorių afiniškumas, matuojamas pagal rišimąsi prie receptorių arba reporterinių genų transkripcijos aktyvinimą *in vitro*, yra informatyvus veiksnys, jis yra tik vienas iš keleto galimo pavojaus determinantų. Kiti galimi determinantai – metabolinis aktyvavimas ir deaktyvavimas patekus į organizmą, pasiskirstymas veikiamuose audiniuose, pašalinimas iš organizmo. Dėl to reikia atlikti galimos cheminės medžiagos veikimo *in vivo* esant tam tikroms sąlygoms ir tam tikram sąlyčiui atrankos analizę. *In vivo* įvertinimas ne toks svarbus, jeigu cheminės medžiagos savybės (absorbcija, pasiskirstymas, metabolizmas, šalinimas (angl. ADME)) yra žinomos. Nuo androgenų priklausomi audiniai, ypač lytinės brandos amžiaus kastruotų žiurkių patinėlių, į stimuliavimą androgenais reaguoja sparčiai ir energingai augdami. Įvairių rūšių graužikai, ypač žiurkės, taip pat plačiai naudojami toksiškumo tyrimuose pavojingumui apibūdinti. Todėl analizės modelis, pagal kurį naudojamos lytinės brandos amžiaus kastruotos žiurkės ir tiriami penki veikiami audiniai, tinka androgenų agonistų ir antagonistų bei 5 α -reduktazės inhibitorių *in vivo* atrankos analizei atlikti.
6. Šis bandymų metodas yra pagrįstas tais EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrime naudotais protokolais, kurie pasitvirtino kaip patikimi ir atkartojami ir vienos laboratorijos, ir skirtingų laboratorijų tyrimuose (4) (5) (6) (7) (8). Į šį bandymų metodą yra įtrauktos ir androgenų, ir antiandrogenų bandymo procedūros.
7. Nors TP dozė, skirtingų laboratorijų naudota pagal EBPO *Hershberger* bioanalizės tinkamumo patvirtinimo programą antiandrogenams nustatyti, šiek tiek skyrėsi (0,2 arba 0,4 mg/kg/d, poodinės injekcijos), skirtumas tarp šių dviejų protokolų variantų, lyginant galimybes nustatyti silpną arba stiprų antiandrogenų poveikį, nebuvo didelis. Tačiau, aišku, TP dozė neturėtų būti labai didelė, kad neblokėtų silpnų androgenų receptorių (AR) antagonistų poveikio, arba labai maža, kad androgeninių audinių augimo atsakas nebūtų silpnas, nors antiandrogenai kartu ir nebūtų duodami.
8. Atskirų nuo androgenų priklausomų audinių augimo atsakas būna ne vien androgeninės kilmės, t. y. kitos cheminės medžiagos, ne vien androgenų agonistai, gali pakeisti tam tikrų audinių masę. Tačiau keleto audinių lygiagreto augimo atsakas patvirtina, kad labiau veikia androgenams būdingas mechanizmas. Pavyzdžiui, dėl didelių stiprių estrogenų dozių gali padidėti sėklinių pūslelių masė; tačiau panašus kitų nuo androgenų priklausomų audinių atsakas atliekant analizę nepasireiškia. Antiandrogeninės cheminės medžiagos gali veikti kaip androgenų receptorių antagonistai arba kaip 5 α -reduktazės inhibitoriai. 5 α -reduktazės inhibitorių poveikis būna įvairus, nes virtimas stipresnio veikimo dihidrotestosteronu skirtinguose audiniuose būna skirtingas. Antiandrogenai, kurie slopina 5 α -reduktazę, pavyzdžiui, finasteridas, palyginti su stipriais AR antagonistais, pavyzdžiui, flutamidu, ryškiau veikia ventralinę prostatos skiltį negu kitus audinius. Šiuo skirtingu audinių atsaku galima remtis norint atskirti, ar tam tikro pobūdžio veikimas yra susijęs su AR, ar 5 α -reduktaze. Be to, androgenų receptoriai yra laipsniškai susiję su kitų steroidinių hormonų veikla, ir kai kurie kiti hormonai, kai yra duodami didelėmis viršfiziologinio dydžio dozėmis, gali surišti TP ir slopinti jo augimą skatinantį poveikį (13). Dar nuo androgenų priklausomų audinių augimas gali sulėtėti dėl aktyvesnio steroidų metabolizmo ir dėl to rezultato – sumažėjusio testosterono kiekio kraujo serume. Todėl įprastu atveju visus teigiamus *Hershberger* bioanalizės rezultatus reikėtų įvertinti įrodomosios vertės metodais, tarp jų – *in vitro* analize, pavyzdžiui, rišimosi prie androgenų ir estrogenų receptorių (ER) analize, atitinkama transkripcijos aktyvinimo analize arba kitokia *in vivo* analize, kuria tiriami panašūs androgenų veikiami audiniai, pavyzdžiui, patinėlių lytinio brendimo analize, 15 dienų nekastruotų suaugusių patinėlių analize, arba 28 arba 90 dienų kartotinės dozės tyrimais.

9. Patirtis rodo, kad ksenobiotiniai androgenai yra retesni negu ksenobiotiniai antiandrogenai. Todėl numatoma, kad *Hershberger* bioanalizė bus dažniausiai taikoma antiandrogenų atrankai. Tačiau androgenų bandymo procedūras vis dėlto galima rekomenduoti taikyti steroidinėms ar steroidams giminingoms cheminėms medžiagos arba cheminėms medžiagoms, kurių galimo androgeninio poveikio požymių pastebėta taikant konceptualios sistemos (2 priedėlis) 1 arba 2 lygmens metodus. Atliekant 5 lygmens analizę taip pat galima pastebėti su (anti)androgeninėmis savybėmis siejamą neigiamą poveikį, todėl reikia įvertinti, ar cheminės medžiagos poveikis yra endokrininio pobūdžio.
10. Pripažįstama, kad visos procedūros, kuriose naudojami gyvūnai, turėtų atitikti vietinius gyvūnų globos reikalavimus; toliau nurodyti globos ir elgesio su gyvūnais reikalavimai yra būtiniausi veiklos reikalavimai, vietinės taisyklės, pavyzdžiui, 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (26), yra už juos viršesnės. Išsamesnės humaniško elgesio su gyvūnais gairės pateiktos EBPO (17).
11. Kaip ir kitais atvejais, kai bioanalizei yra naudojami bandomieji gyvūnai, reikėtų kruopščiai įvertinti, ar šis tyrimas tikrai būtinas. Iš esmės toks sprendimas gali būti grindžiamas dviem priežastimis:
 - yra didelė sąlyčio tikimybė (konceptualios sistemos 1 lygmuo) arba atliekant *in vitro* analizę pastebėti (anti)androgeninio poveikio požymiai (2 lygmuo), todėl reikia nustatyti, ar toks poveikis gali pasireikšti *in vivo*;
 - atliekant 4 arba 5 lygmens *in vivo* bandymus pasireiškia (anti)androgeninį poveikį atitinkantys požymiai, todėl konkretų veikimo būdą reikia ištirti, pvz., nustatyti, ar poveikis pasireiškė dėl (anti)androgeninio mechanizmo.
12. Sąvokos, vartojamos šiame bandymų metodo aprašyme, pateiktos 1 priedėlyje.

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

13. *Hershberger* bioanalizės jautrumas užtikrinamas naudojant patinėlius, kurių organizme vyksta minimali endogeninių androgenų gamyba. Tam naudojami kastruoti patinėliai, praėjus pakankamai laiko nuo kastravimo, kad veikiami audiniai regresuotų iki minimalios, vienodos pradinės masės. Taigi atliekant stiprių androgenų atrankos analizę endogeninis cirkuliuojančių androgenų lygis būna žemas ir būna padaryta taip, kad pogumburio–hipofizės–lytinių liaukų ašis nebegalėtų jo kompensuoti atsako mechanizmais, audinių gebėjimas reaguoti būtų kuo didesnis, o pradinės audinio masės skirtumai – kuo mažesni. Atliekant galimo antiandrogeninio veikimo atrankos analizę, nuoseklesnių audinių masės prieaugio rezultatų galima gauti, kai audiniai stimuliuojami etaloniniu androgenu. Todėl *Hershberger* bioanalizei atlikti reikia imti tik po 6 kiekvieno dydžio dozės grupės gyvūnus, o kitais atvejais analizei, kuriai naudojami nekastruoti lytiškai subrendę arba suaugę patinėliai, rekomenduojama naudoti po 15 kiekvieno dydžio dozės grupės patinėlių.
14. Lytinės brandos amžiaus žiurkių patinėlius reikėtų kastruoti reikiamu būdu, tam naudoti patvirtintus anestetikus ir taikyti sterilius metodus. Pirmas kelias dienas po operacijos reikėtų duoti analgetikų, kad gyvūnai nepatirtų pooperacinio diskomforto. Kastracija padidina analizės, skirtos silpniems androgenams ir antiandrogenams nustatyti, tikslumą, nes kastruojant pašalinami kompensaciniai endokrininiai atsakomieji mechanizmai, veikiantys nekastruotų gyvūnų organizme ir galintys sumažinti duodamų androgenų ir antiandrogenų poveikį, ir eliminuojami dideli testosterono kiekio skirtingų gyvūnų kraujo serume skirtumai. Taigi, kai naudojami kastruoti gyvūnai, šio endokrininio veikimo atrankos analizei jų reikia mažiau.
15. Kai atliekama galimo androgeninio veikimo atrankos analizė, bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąją traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis kasdien dešimt dienų iš eilės. Bandomosios cheminės medžiagos duodama ne mažiau kaip dviem dozėmis gaunantiems bandomųjų gyvūnų grupėms, kiekvienai grupei duodamos to paties dydžio dozės. Gyvūnų nekroskopija atliekama praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės dozės davimo. Statistiškai reikšmingas dviejų arba daugiau veikiamų organų masės padidėjimas bandomosios cheminės medžiagos grupėse, palyginti su nešiklio kontroline grupe, rodo, kad bandomoji cheminė medžiaga gali veikti kaip androgenas (žr. 60 punktą). Androgenų, pavyzdžiui, trenbolono, kurio 5 α – reduktazė negali veikti, poveikis, palyginti su TP poveikiu, yra ryškesnis išangės pakeliamajam raumeniui ir stormeniniam akytkūnio raumeniui bei varpos galvai, tačiau turėtų pasireikšti didesnis visų audinių augimas.
16. Kai atliekama galimo antiandrogeninio veikimo atrankos analizė, bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąją traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis kasdien dešimt dienų iš eilės, kartu kasdien sušvirkščiant poodines TP injekcijas (0,2 arba 0,4 mg/kg/d). Per tinkamumo patvirtinimo programą nustatyta, kad galima švirkšti 0,2 arba 0,4 mg/kg/d TP injekcijas, nes abiejų dydžių dozės yra veiksmingos ir padeda aptikti

antiandrogenus, todėl atliekant analizę reikėtų pasirinkti tik vieno dydžio dozę, kuri bus naudojama. Skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės duodamos ne mažiau kaip trims dozės gaunančioms bandomųjų gyvūnų grupėms, kiekvienai grupei duodamos to paties dydžio dozės. Gyvūnų nekroskopija atliekama praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės dozės davimo. Statistiškai reikšmingas dviejų arba daugiau veikiamų organų masės sumažėjimas grupėse, kurių gyvūnams duota bandomosios cheminės medžiagos ir TP, palyginti su kontroline grupe, kurios gyvūnams duota tik TP, rodo, kad bandomoji cheminė medžiaga gali veikti kaip antiandrogenas (žr. 61 punktą).

METODO APRAŠYMAS

Rūšių ir veislės parinkimas

17. *Hershberger* bioanalizei nuo 4-ojo dešimtmečio yra naudojamos žiurkės. Nors biologiniu požiūriu gali būti, kad ir žiurkėms, ir pelėms pasireikštų panašus atsakas, bet remiantis 70 metų patirtimi taikant modelį, pagal kurį naudojamos žiurkės, *Hershberger* bioanalizei pasirinktos žiurkės. Be to, kadangi *Hershberger* bioanalizė gali būti pradinė, atliekama prieš ilgalaikį tyrimą, abiem tyrimams galima naudoti tos pačios rūšies, veislės ir to paties šaltinio gyvūnus.
18. Pagal šį protokolą laboratorijoms leidžiama pasirinkti tą žiurkių, kurios bus naudojamos tyrime, veislę, kurią anksčiau naudojo tyrime dalyvaujanti laboratorija. Galima naudoti dažniausiai naudojamų veislių žiurkes; tačiau tų veislių žiurkės, kurios subręsta daug vėliau negu per 42 dienas nuo atsivedimo, neturėtų būti naudojamos, nes kastravus 42 dienų amžiaus patinėlius gali būti neįmanoma išmatuoti varpos galvos masės: ją išmatuoti galima tik tada, kai apyvarpė atsiskiria nuo varpos kūno. Taigi veislių, išvestų iš *Fisher 344* žiurkių, nereikėtų naudoti, išskyrus retus atvejus. *Fisher 344* žiurkių lytinio vystymosi laikotarpis yra kitoks negu kitų dažnai naudojamų veislių, pavyzdžiui, *Sprague Dawley* arba *Wistar*, žiurkių (16). Jeigu ketinama naudoti tokią veislę, laboratorija turėtų šios veislės žiurkes kastruoti kiek vyresnio amžiaus ir gebėti įrodyti naudojamos veislės jautrumą. Laboratorija turėtų aiškiai nurodyti pagrindines priežastis, nulėmusias tos veislės žiurkių pasirinkimą. Jeigu atrankos analizė yra pradinė, atliekama prieš kartotinių dozių bandymą per virškinamąjį traktą, dauginimosi ir vystymosi tyrimą arba ilgalaikį tyrimą, geriausia, jei visuose tyrimuose būtų naudojami tos pačios veislės ir to paties šaltinio gyvūnai.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

19. Visos procedūros turėtų atitikti laboratorinių gyvūnų priežiūros vietinius reikalavimus. Šiose nuostatose pateikti tik būtiniausi gyvūnų priežiūros ir elgesio su gyvūnais reikalavimai, ir griežtesnės vietinės taisyklės, pavyzdžiui, 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos, yra už juos viršesnės (26). Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti 22 °C (gali svyruoti apie ± 3 °C). Santykinė oro drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką. Reikėtų siekti, kad santykinė drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis. Per parą apšvietimo seka turėtų būti 12 h šviesos ir 12 h tamsos.
20. Gyvūnus geriau laikyti grupėmis, o ne izoliuotus, dėl to, kad gyvūnai yra jauni, ir dėl to, kad žiurkės yra socialūs gyvūnai. Kai viename narvelyje gyvūnai laikomi po du arba tris, išvengiama susigrūdimo ir su tuo susijusio streso, kuris gali paveikti hormoninę pagalbinių lyties audinių vystymosi kontrolę. Narvelius reikėtų kruopščiai išvalyti, kad būtų pašalinti galimi teršalai, ir išdėstyti taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Gyvūnų susigrūdimo bus išvengta, jei bus naudojami tinkamo dydžio (~ 2 000 kvadratinų centimetrų ploto) narveliai.
21. Kiekvieną gyvūną reikėtų humanišku būdu atskirai paženklinėti (pvz., ausies žyma arba įsagu). Tai, koks ženklavimo metodas taikomas, reikėtų užrašyti.
22. Laboratorinis pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. *Hershberger* bioanalizę atliekančios laboratorijos turėtų naudoti dažniausiai per bandymus su cheminėmis medžiagomis naudojamus pašarus. Bioanalizės tinkamumo patvirtinimo tyrimuose nepastebėta jokio su pašarais susijusio poveikio arba pokyčių. Tai, kokie pašarai naudojami, užrašoma; vieną laboratorinių pašarų mėginį reikėtų pasilikti, jei ateityje prireiktų jį išanalizuoti.

Nuo androgenų priklausomų organų masės pokyčių rezultatų kriterijai

23. Per tinkamumo patvirtinimo tyrimą negauta duomenų, kad kūno masės mažėjimas turėtų poveikio tiriamų audinių (t. y. audinių, kuriuos per šį tyrimą reikėtų sverti) masės didėjimui arba mažėjimui.

24. Iš įvairių tinkamumo patvirtinimo programoje sėkmingai naudotų veislių žiurkių nuo androgenų priklausomų organų masė yra didesnė sunkesnių veislių žiurkių, palyginti su lengvesnėmis veislėmis. Todėl absoliuti organų masė, kurios reikėtų tikėtis teigiamų ir neigiamų kontrolinių rezultatų atvejais, nėra įtraukta į *Hershberger* bioanalizę kaip rezultatų kriterijus.
25. Kadangi audiniui nustatytas variacijos koeficientas (angl. CV) yra atvirkščiai proporcingas statistinei galiai, *Hershberger* bioanalizės rezultatų kriterijai yra grindžiami didžiausia kiekvienam tiriamam audiniui nustatyta variacijos koeficiento verte (1 lentelė). Variacijos koeficientai nustatyti per EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimus. Jeigu gaunami neigiami rezultatai, laboratorijos turėtų išnagrinėti kontrolinės grupės ir didelę dozę gaunančios grupės variacijos koeficientų vertes ir nustatyti, ar nebuvo viršytos didžiausios šių rezultatų kriterijų – variacijos koeficientų – vertės.
26. Tyrimą reikėtų pakartoti, jeigu: 1) trys arba daugiau iš dešimties galimų atskirų variacijos koeficientų kontrolinėje grupėje ir didelės dozės gaunančioje grupėje viršija maksimalias vertes, nustatytas agonistų ir antagonistų tyrimams, kaip nurodyta 1 lentelėje, ir 2) bent dviejų tiriamų audinių pokytis buvo nereikšmingas, t. y. r vertės buvo 0,05–0,10.

1 lentelė

Didžiausios leidžiamos variacijos koeficientų vertės, pagal EBPO tinkamumo patvirtinimo tyrimus nustatytos veikiams pagalbiniais lyties audiniais, kai taikomas kastruotų gyvūnų modelis ⁽¹⁾

Audinys	Antiandrogeninis poveikis	Androgeninis poveikis
Sėklinės pūslelės	40 %	40 %
Ventralinė prostatos skiltis	40 %	45 %
Išangės pakeliamasis raumuo ir stormeninis akytkūnio raumuo	20 %	30 %
Kuperio liaukos	35 %	55 %
Varpos galva	17 %	22 %

BANDYMO PROCEDŪRA

Atitiktis taisyklėms ir laboratorijos patikrinimas

27. Kitaip negu poveikiu gimdai pagrįstoje analizėje (šio priedo B.54 skyrius), prieš pradedant *Hershberger* analizę laboratorijos kompetencijos tikrinti nereikia, nes per tyrimą kartu atliekama ir teigiama (testosterono propionatas ir flutamidas), ir neigiama kontrolė.

Gyvūnų skaičius ir būklė

28. Kiekvienoje dozės gaunančioje ir kontrolinėje grupėje turi būti mažiausiai 6 gyvūnai. Tai galioja ir androgenų, ir antiandrogenų protokolams.

Kastracija

29. Gyvūnus priėmus reikėtų leisti jiems keletą dienų aklimatizuotis, siekiant įsitikinti, ar jie yra sveiki ir gyvybingi. Kadangi iki 42 dienų amžiaus arba iki 42-os postnatalinės dienos gyvūnų, kuriuos ketinama kastruoti, apyvarpė dar gali būti neatsiskyrusi, gyvūnus reikėtų kastruoti 42-ą arba vėlesnę PND, ne anksčiau. Gyvūnai kastruojami taikant anesteziją – kapšelis įpjauamas, abi sėklidės ir antiseklidžiai išimami, kraujagyslės ir sėkliniai latakai perišami. Įsitikinus, kad kraujavimo nėra, kapšelis užsiuvamas arba sukabinamas chirurginėmis kabėmis. Pirmas kelias dienas po operacijos gyvūnams reikėtų duoti analgetikų pooperaciniam diskomfortui sumažinti. Jeigu iš gyvūnų tiekėjo išgijami jau kastruoti gyvūnai, tiekėjas turėtų užtikrinti, kad gyvūnų amžiaus ir lytinio subrendimo etapo duomenys yra teisingi.

⁽¹⁾ Atitinkamo audinio variacijos koeficiento apatinė riba buvo nustatyta pagal eilės tvarka nuo mažiausios iki didžiausios išdėstytas variacijos koeficiento vertes – visus per visus tinkamumo patvirtinimo bandymus taikant konkretų modelį (agonistų arba antagonistų) apskaičiuotus vidurkius. Variacijos koeficiento riba brėžta tame taške, kuriame padidėjimo intervalas iki artimiausios didžiausios variacijos koeficiento vertės šioje sekoje yra daug didesnis negu tarp keleto prieš tai išdėstytų variacijos koeficientų verčių – „trūkio taške“. Reikėtų pažymėti, kad nors pagal šią analizę antagonistų modeliui nustatyti santykinai patikimi „trūkio taškai“, agonistų analizės variacijos koeficientų kreivės atspindėjo vienodą didėjimą, todėl apatinės variacijos koeficientų ribos šiuo metodu nustatytos kiek dirbtinai.

Aklimizavimas po kastracijos

30. Gyvūnams po kastracijos reikėtų leisti dar bent 7 dienas aklimatizuotis laboratorijos sąlygomis ir tiriamų audinių masei regresuoti. Gyvūnus reikėtų kasdien stebėti ir pašalinti visus gyvūnus, kuriems pasireiškia ligos arba fizinės anomalijos požymių. Taigi dozes galima pradėti duoti (tyrimo metu) jau 49-ą PND, bet ne vėliau kaip 60-ą PND. Gyvūnų amžius nekroskopijos metu turėtų būti ne didesnis kaip 70 PND. Šis lankstumas suteikia galimybę laboratorijai veiksmingai suplanuoti bandymo eigą.

Kūno masė ir grupės sudarymas atsitiktine tvarka

31. Atskirų gyvūnų kūno masės skirtumai nulemia audinių masės skirtumus ir vienoje grupėje, ir tarp skirtingų grupių. Padidėjus audinio masės skirtumams, padidėja variacijos koeficientas (angl. CV) ir sumažėja tyrimo statistinė galia (kartais dar vadinama tyrimo jautrumu). Todėl kūno masės variacijas reikėtų kontroliuoti ir bandymo, ir statistinėmis priemonėmis.
32. Kontrolė bandymo priemonėmis – tai užtikrinimas, kad kūno masės reikšmės ir tarp vienos bandymo grupės, ir tarp skirtingų bandymo grupių gyvūnų skirtumai nedaug. Pirma, reikėtų vengti naudoti neįprastai mažus arba didelius gyvūnus ir jų neįtraukti į bandymo kohortą. Naudojamų gyvūnų masė bandymo pradžioje neturi skirtis daugiau kaip $\pm 20\%$, palyginti su vidutine mase (pvz., lytinės brandos amžiaus kastruotų žiurkių: $175\text{g} \pm 35\text{g}$). Antra, gyvūnus reikėtų suskirstyti į grupes (kontrolinę ir gaunančią dozes) atsitiktine tvarka pagal masę, kad kiekvienos grupės kūno masės vidurkis statistškai nesiskirtų nuo kitų grupių. Bloko atsitiktinės atrankos procedūrą reikėtų aprašyti.
33. Kadangi dėl toksikumo dozės gaunančios grupės gyvūnų kūno masę, palyginti su kontrolinės grupės, gali sumažėti, kaip statistinį lydinį kintamąjį galima naudoti kūno masę pirmosiomis bandomosios cheminės medžiagos davimo dienomis, o ne nekroskopijos metu.

Dozavimas

34. Norint nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga gali daryti androgeninį poveikį *in vivo*, paprastai pakanka dviejų dydžių bandomosios cheminės medžiagos dozių grupių, teigiamos kontrolės ir nešiklio (neigiamos) kontrolės grupės (žr. 43 punktą), todėl rūpinantis gyvūnų gerove tokiai struktūrai yra teikiama pirmenybė. Jeigu siekiama nubrėžti dozės ir atsako tarpusavio ryšio kreivę arba duomenis ekstrapoliuoti mažesnėms dozėms, reikalingos bent trijų dydžių dozės grupės. Jeigu reikalinga informacija ne tik apie androgeninį veikimą (pavyzdžiui, reikia įvertinti stiprumą), reikėtų pasirinkti kitokį dozavimo režimą. Atliekant bandymus su antiandrogenais bandomoji cheminė medžiaga duodama kartu su etaloniniu androgenų agonistu. Reikėtų naudoti ne mažiau kaip 3 bandomąsias grupes, kurioms duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės, teigiamos ir neigiamos kontrolės grupės (žr. 44 punktą). Kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja chemine medžiaga. Jei bandomoji cheminė medžiaga duodama naudojant nešiklį, kontrolinei grupei turėtų būti duodamas didžiausias nešiklio kiekis iš duodamo bandymo grupėms.
35. Visus dozės dydžius reikėtų siūlyti ir pasirinkti atsižvelgiant į jau turimus bandomosios cheminės medžiagos ar jai giminingos medžiagos toksikumo ir (toksiko)kintinius duomenis. Pasirenkant didžiausią dozę reikėtų atsižvelgti, pirma, į LD50 ir (arba) ūmaus toksikumo informaciją, kad būtų išvengta gyvūnų nugaishimo, didelio skausmo arba kančių (17) (18) (19) (20), ir, antra, į turimą informaciją apie poūmio ir ūmaus toksikumo bandymuose naudojamas dozes. Apskritai didžiausia dozė neturėtų sukelti galutinės gyvūnų kūno masės sumažėjimo daugiau kaip 10 %, palyginti su kontroline mase. Didžiausia dozė turėtų būti mažesnė iš šių dozių: 1) didžiausia dozė, kurią duodant 10 dienų iš eilės ir didinant iki maksimalaus 1 000 mg/kg/d dydžio, užtikrinama, kad gyvūnai nenugaiš, jiems nepasireikš reikšmingas toksinis poveikis ir jie nepatirs didelių kančių (žr. 36 punktą), arba 2) dozė, daranti (anti)androgeninį poveikį. Atrankos tikslais dideli intervalai, pvz., po pusę log vieneto (tai atitinka dozės progresiją 3,2) arba net po vieną log vieneta tarp dozių yra priimtini. Jeigu nėra tinkamų duomenų, padedančių nustatyti dozes, galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo bandymą (žr. 37 punktą).

Ribinis dozės dydis

36. Jeigu atliekant bandymą ir duodant ribinę 1 000 mg/kg kūno masės per dieną dozę ir mažesnę dozę šiame tyrime aptarta tvarka statistškai reikšmingas dauginimosi organo masės pokytis nesukeliamas, tada galima daryti išvadą, kad papildomų dydžių dozės nereikalingos. Nuostatos dėl ribinės dozės netaikomos tais atvejais, kai, atsižvelgiant į žmonių sąlygtį su medžiaga, reikia naudoti didesnio dydžio dozes.

Dozės dydžio intervalo nustatymas

37. Jeigu reikia, iš pradžių galima atlikti dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą su keliais gyvūnais ir pasirinkti reikiamas dozės grupes [taikant ūmaus toksiškumo bandymų metodus (šio priedo B.1 bis, B.1 tris skyriai (27), EBPO Bandymų gairės Nr. 425 (19))]. *Hershberger* biologiniam tyrimui reikia parinkti tokias dozes, kad būtų užtikrinta, jog cheminę medžiagą duodant dešimt dienų iš eilės ir dozę didinant iki maksimalaus 1 000 mg/kg/d kiekio gyvūnas nenugaiš, jam nepasireikš reikšmingas toksinis poveikis ir jis nepatirs didelių kančių, kaip pažymėta 35 ir 36 punktuose. Šiuo tikslu toksiškumo gyvūnams arba kančių klinikiniais požymiais apibūdinti galima remtis EBPO Rekomendaciniu dokumentu (17). Jeigu pagal šį dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimą tai yra įmanoma, po dešimties dozės davimo dienų, praėjus 24 valandoms po paskutinės dozės davimo, tiriamus audinius galima išpjauti ir pasverti. Tuomet tais duomenimis galima pasinaudoti pasirenkant dozes pagrindiniam tyrimui.

Etaloninės cheminės medžiagos ir nešiklis

38. Etaloninis androgenų agonistas turėtų būti testosterono propionatas (TP), CAS Nr. 57–82–5. Etaloninė TP dozė gali būti 0,2 mg/kg KM/d arba 0,4 mg/kg KM/d. Etaloninis androgenų antagonistas turėtų būti flutamidas (FT), CAS Nr. 1311–84–7. Etaloninė FT dozė turėtų būti 3 mg/kg kūno masės/d, FT reikėtų duoti kartu su etaloninio TP doze.
39. Jeigu yra įmanoma, pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpalą arba suspensiją. Tačiau, kadangi dauguma androgenų ligandų arba jų metabolinių prekursorių dažnai būna hidrofobiniai, dažniausiai naudojamas tirpalas arba aliejinė suspensija (pvz., su kukurūzų, žemės riešutų, sezamo arba alyvuogių aliejumi). Bandomąsias chemines medžiagas galima ištirpinti minimaliame 95 % etanolio arba kito atitinkamo tirpiklio kiekyje ir atskiesti iki darbinės koncentracijos, esančios bandomajame nešiklyje. Toksinės tirpiklio savybės turėtų būti žinomos, jas reikėtų išbandyti atskiroje kontrolinėje grupėje, kurioje naudojamas tik tirpiklis. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga yra laikoma stabilia, tam, kad lengviau tirptų, galima ją lengvai pakaitinti, greitai mechanškai pamaišyti. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą nešiklyje. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga per visą tyrimą išlieka stabili, galima parengti vieną pradinę alikvotinę bandomosios cheminės medžiagos dalį ir kasdien ją skiesti nustatytais dozėmis, ėmusis atsargumo priemonių, kad mėginiai nebūtų užteršti ir sugadinti.

Dozių davimas

40. TP reikėtų duoti poodinėmis injekcijomis, FT – per virškinamąjį traktą naudojant zondą.
41. Bandomoji cheminė medžiaga duodama per virškinamąjį traktą naudojant zondą arba poodinėmis injekcijomis. Pasirenkant davimo būdą reikia atsižvelgti į gyvūnų gerovę, taip pat į fizikines ir chemines bandomosios cheminės medžiagos savybes. Be to, prieš pradedant intensyvius ilgalaikius bandymus, jei injekcija gaunami teigiami rezultatai, taip pat reikia atsižvelgti į toksikologinius aspektus, pavyzdžiui, artimumą žmonių sąlyčio su chemine medžiaga būdai (pvz., zondų atkartojamas sąlytis per virškinamąjį traktą, poodinėmis injekcijomis – sąlytis per kvėpavimo takus arba sugertis per odą), į turimą toksikologinę informaciją ir duomenis apie metabolizmą ir kinetiką (t. y. tai, kad reikia vengti pirmojo pasažo metabolizmo, arba tai, kad poveikis būna didesnis, jei duodama tam tikru būdu).
42. Gyvūnams dozes reikėtų duoti tokiu pačiu būdu ir periodiškumu dešimt dienų iš eilės maždaug kas 24 valandas. Dozės dydį reikėtų kasdien tikslinti remiantis lygiagrečiai atliekamais kūno masės matavimais. Dozę ir davimo laiką reikėtų kasdien, davus dozę, užrašyti. Kad gautus duomenis būtų galima prasmingai aiškinti, reikėtų stengtis neviršyti maksimalios 35 punkte aptartos dozės. Kūno masės sumažėjimą, klinisinius požymius ir kitus gautus duomenis tuo tikslu reikėtų kruopščiai vertinti. Kaip virškinamojo trakto zondą reikėtų naudoti skrandžio zondą arba atitinkamą intubacijos vamzdelį. Didžiausias gyvūnui duodamas vienkartinis skysčio tūris priklauso nuo bandomo gyvūno dydžio. Reikėtų laikytis vietos gyvūnų priežiūros taisyklių, tačiau šis kiekis neturėtų būti didesnis kaip 5 ml/kg kūno masės, išskyrus vandeninius tirpalus, kurių galima duoti po 10 ml/kg kūno masės. Kai daromos poodinės injekcijos, dozės turėtų būti leidžiamos mentikaulio arba strėnų srityje sterilia adata (pvz., 23 arba 25 dydžio) ir tuberkulino švirkštu. Injekcijos vietos nuskusti nebūtina. Jei dozė prarandama, injekcijos vietoje prateka arba suduodama ne visa, tai reikėtų užrašyti. Bendras vienai žiurkei per dieną sušvirkščiamas injekcijos kiekis neturėtų viršyti 0,5 ml/kg kūno masės.

Specialios androgenų agonistams skirtos procedūros

43. Atliekant bandymus su androgenų agonistais, nešiklio grupė yra neigiamos kontrolės grupė, grupė, kuriai duodama TP dozės, – teigiamos kontrolės grupė. Androgenų agonistų veikimą atitinkanti biologinė veikla yra bandoma duodant bandomąją cheminę medžiagą pasirinktomis dozėmis dozės gaunančioms grupėms 10 dienų iš eilės. Bandomosios cheminės medžiagos grupės gyvūnų penkių pagalbinių lyties audinių masė yra lyginama su nešiklio grupės mase ir tikrinama, ar esama statistiškai reikšmingo masės padidėjimo.

Specialios androgenų antagonistams ir 5α-reduktazės inhibitoriams skirtos procedūros

44. Atliekant bandymus su androgenų antagonistais ir 5α-reduktazės inhibitoriais, grupė, kuriai duodama TP, yra neigiamos kontrolės grupė, o grupė, kuriai tuo pat metu duodamos etaloninės TP ir FT dozės yra teigiamos kontrolės grupė. Androgenų antagonistų ir 5α-reduktazės inhibitorių veikimą atitinkančios biologinės veiklos bandymai atliekami duodant etaloninę TP dozę ir bandomosios cheminės medžiagos dozę 10 dienų eilės. Grupės, kuriai duodama ir TP, ir bandomosios cheminės medžiagos, gyvūnų penkių pagalbinių lyties audinių masė yra lyginama su grupės, kuriai duodama tik etaloninė TP dozė, mase ir tikrinama, ar esama statistiškai reikšmingo masės padidėjimo.

STEBĖJIMAI**Klinikiniai stebėjimai**

45. Bendrus klinikinius stebėjimus reikėtų atlikti bent kartą per dieną ir dažniau, jei pastebima toksiškumo požymių. Stebėjimus geriausia atlikti tuo pačiu metu, kiekvieną dieną, atsižvelgiant į didžiausio laukiamo poveikio po dozės davimo laiką. Reikėtų tikrinti visus gyvūnus, ar jie nenugaišo, ar negaišta, vertinti bendrus klinikinius požymius, pavyzdžiui, elgsenos, odos, kailio, akių, gleivinės pakitimus, sekreto ir ekskrecijų dažnį, autonominių aktyvumą (pvz., ašarojimą, plaukų pašiaušimą, vyzdžio dydį, neįprastą kvėpavimą).
46. Jeigu gyvūnas randamas nugaišęs, jis išimamas ir sutvarkomas, o jo duomenys toliau neanalizuojami. Duomenis apie gyvūnus, nugaišusius iki nekroskopijos, reikėtų įtraukti į tyrimo duomenis, kartu nurodyti akivaizdžias nugaišimo priežastis. Visus gaištančius gyvūnus reikėtų humaniškai numarinti. Duomenis apie gaišusius ir vėliau numarintus gyvūnus reikėtų įtraukti į tyrimo duomenis, kartu nurodyti akivaizdžias priežastis, dėl kurių gyvūnai ėmė gaišti.

Kūno masė ir pašaro suvartojimas

47. Visus gyvūnus reikėtų kasdien pasverti 0,1 g tikslumu, pradedant sverti prieš pat tyrimo pradžią, t. y. kai gyvūnai suskirstomi į grupes. Kitas būdas – galima matuoti per tyrimą kiekvieno narvelio gyvūnų suvartojamo pašaro kiekį sveriant šėrimo įrenginį. Pašaro suvartojimo rezultatus reikėtų išreikšti gramais vienai žiurkei per dieną.

Skrodimas ir audinių bei organų masės matavimas

48. Praėjus maždaug 24 valandoms po paskutinės bandomosios cheminės medžiagos dozės davimo žiurkes reikėtų numarinti, nukraujinti įprasta tyrimą vykdančios laboratorijos taikoma tvarka ir atlikti nekroskopiją. Duomenis apie humaniško numarینimo metodą reikėtų įtraukti į laboratorijos ataskaitą.
49. Idealiu atveju nekroskopijai gyvūnus reikėtų imti atsitiktine tvarka iš įvairių grupių, siekiant išvengti tiesioginės didėjančios ar mažėjančios progresijos kurioje nors dozės grupėje, nes tai galėtų paveikti duomenis. Visus per nekroskopiją gautus duomenis, t. y. apie patologinius pokyčius ir (arba) matomus pažeidimus, reikėtų pažymėti ir nurodyti ataskaitoje.
50. Penis nuo androgenų priklausomus audinius (ventralinę prostatos skiltį, sėklines pūsles, išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį, Kuperio liauką, varpos galvą) reikėtų pasverti. Šiuos audinius reikėtų išpjauti, atsargiai pašalinti nereikalingus suaugusius audinius ir riebalinį sluoksnį bei sverti šviežius (nefiksuotus). Kiekvieną audinį reikėtų tvarkyti itin atsargiai, kad jie neprarastų skysčių ir neišdžiūtų, nes dėl to gali rasti reikšmingų klaidų ir padidėti duomenų variacija, kadangi bus užregistruota mažesnė masė. Kai kurie audiniai gali būti

labai maži arba juos gali būti sunku išskirti, jau dėl to atsirastų duomenų variacija. Todėl svarbu, kad lyties pagalbinių audinių skrodimą atliekantys asmenys išmanytų standartines šių audinių skrodimo procedūras. EBPO yra parengusi standartinės operavimo tvarkos (angl. SOP) vadovą skrodimams (21). Kruopščiai pasirengus pagal standartinės operavimo tvarkos vadovą galima užtikrinti, kad galimų variacijos šaltinių tyrime būtų kuo mažiau. Idealiu atveju už konkrečaus audinio skrodimą turėtų būti atsakingas tas pats prozektorius, siekiant pašalinti skirtumus, galinčius atsirasti dėl to, kad skirtingi prozektoriai audinius tvarko skirtingai. Jeigu to padaryti neįmanoma, nekroscopiją reikėtų suplanuoti taip, kad vienas prozektorius skrostų tam tikrus visų dozes gavusių grupių gyvūnų audinius ir nebūtų taip, kad vienas asmuo skrostų visus kontrolinės grupės gyvūnų audinius, o kitas būtų atsakingas už dozes gavusias grupes. Kiekvieno gyvūno kiekvieną lyties pagalbinį audinį reikėtų pasverti nenusausintą 0,1 mg tikslumu ir mases užrašyti.

51. Kai kurie audiniai gali būti labai maži arba juos gali būti sunku išskirti, jau dėl to atsirastų duomenų variacija. Atliekant ankstesnius darbus nustatyta įvairių variacijos koeficientų, kurie būna skirtingi ir priklauso nuo laboratorijos kompetencijos. Keletu atvejų vienoje konkrečioje laboratorijoje buvo pastebėta didelių tokių audinių kaip ventralinė prostatos skiltis arba Kuperio liaukos absoliučios masės skirtumų.
52. Kepenų, abiejų inkstų ir antinksčių masės matavimai nėra privalomi. Vėlgiai nuo audinių reikėtų pašalinti visą nereikalingą fasciją ir riebalus. Kepenis reikėtų pasverti ir duomenis užrašyti 0,1 g tikslumu, abu inkstus ir antinksčius reikėtų pasverti ir duomenis užrašyti 0,1 mg tikslumu. Kepenys, inkstai ir antinksčiai yra ne tik androgenų veikiami organai; pagal juos taip pat galima iširti naudingus sisteminio toksiškumo rodiklius.
53. Liuteinizuojančio hormono (LH), folikulus stimuliuojančio hormono (FSH) ir testosterono (T) kiekio serume matavimai nėra privalomi. Testosterono lygis serume yra naudingas rodiklis, kai norima nustatyti, ar bandomoji cheminė medžiaga skatina testosterono metabolizmą kepenyse, mažindama jo lygį serume. Neturint testosterono duomenų toks poveikis gali būti priskirtas antiandrogeniniam mechanizmui. Liuteinizuojančio hormono lygiai suteikia informacijos apie antiandrogeno gebėjimą ne tik mažinti organo masę, bet ir paveikti pogumburio–hipofizės funkciją, o tai atliekant ilgalaikius tyrimus gali paskatinti atsirasti sėklidžių auglius. Folikulus stimuliuojantis hormonas yra svarbus spermatogenezės hormonas. T4 ir T3 kiekio serume rodikliai taip pat nėra privalomi, bet suteikia naudingos papildomos informacijos apie gebėjimą ardyti skydliaukės hormonų homeostazę. Jeigu reikia atlikti hormonų matavimus, žiurkėms prieš nekroscopiją reikėtų duoti anestetiko ir atliekant kardialinę punkciją paimti jų kraujo, anestezijos metodą reikėtų pasirinkti atidžiai – tokį, kuris nedarytų poveikio hormonų matavimui. Serumo paruošimo metodą, radioimunologinę analizę arba kitas matavimo priemones, analizės procedūras ir rezultatus reikėtų aprašyti. Liuteinizuojančio hormono lygius reikėtų nurodyti ng viename serumo ml, testosterono lygį taip pat reikėtų nurodyti ng viename serumo ml.
54. Audinių skrodimas yra aprašytas išsamiaje skrodimo vadove, kuriame kaip papildoma medžiaga pateikiamos vykdančios tinkamumo patvirtinimo programą padarytos nuotraukos (21). Skrodimo vaizdinė medžiaga yra paskelbta Korėjos maisto ir vaistų administracijos tinklalapyje (22).

- Gyvūną paguldžius ventraline puse į viršų patikrinti, ar apyvarpė yra atsiskyrusi nuo varpos galvos. Jei taip, atitraukti apyvarpę ir atskirti varpos galvą, ją pasverti (0,1 mg tikslumu) ir masę užrašyti.
- Atverti pilvo odą ir sienelę, atidengiant vidaus organus. Jeigu norima pasverti neprivalomus sverti organus, išimti ir 0,1 g tikslumu pasverti kepenis, išimti skrandį ir žarnas, išimti ir 0,1 mg tikslumu pasverti abu inkstus ir antinksčius. Šiuos organus išpjovus atidengiama šlapimo pūslė ir pradedamas tiriamų vyriškųjų pagalbinių audinių skrodimas.
- Norint išpjauti ventralinę prostatos skiltį, šlapimo pūslę reikia atskirti nuo ventralinio raumenų sluoksnio išilgai, per vidurį perpjaujant jungiamąjį audinį. Šlapimo pūslę pastumti į priekį sėklinių pūslelių link, atidengiant kairiąją ir dešiniąją ventralinės prostatos skiltis (dengiamas riebalinio sluoksnio). Atsargiai nupjauti riebalinį sluoksnį nuo dešinėsios ir kairiosios ventralinės prostatos skilčių. Švelniai išstumti ventralinės prostatos dešiniąją skiltį iš šlaplės ir nupjauti. Laikant dešiniąją ventralinės prostatos skiltį, švelniai išstumti ventralinės prostatos kairiąją skiltį iš šlaplės ir nupjauti; 0,1 mg tikslumu pasverti ir masę užrašyti.
- Norint išpjauti sėklines pūsles ir koaguliacijos liaukas, reikia pastumti šlapimo pūslę uodegos link, atidengiant sėklinį lataką ir dešiniąją bei kairiąją sėklines pūsles ir koaguliacijos liaukas. Kad neištekėtų skystis, hemostatu užspausti sėklinių pūslelių ir koaguliacijos liaukų pagrindą sėklinio latako ir šlaplės susijungimo vietoje. Atsargiai išpjauti sėklines pūsles ir koaguliacijos liaukas, nenuėmus hemostato nupjauti riebalus ir jungiamuosius audinius, įdėti į prieš tai pasvertą svėrimo vonelę, nuimti hemostatą, 0,1 mg tikslumu pasverti ir masę užrašyti.

- Norint išpjauti išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį atidengiami raumenys ir varpos pagrindas. Išangės pakeliamieji raumenys yra išsidėstę aplink gaubtinę žarną, priešakinė išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens dalis yra prisitvirtinusi prie varpos stormens. Oda ir jungiamieji audiniai atskiriami nuo tarpvietės, einančios nuo varpos pagrindo iki priekinės išangės dalies. Stormeniniai akytkūnio raumenys laipsniškai nupjaunami nuo stormens ir audinių. Gaubtinė žarna perpjaunama į dvi dalis, tada galima išpjauti ir išimti visą išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens bloką. Nuo išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens reikėtų nupjauti riebalinį sluoksnį ir jungiamuosius audinius, išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį 0,1 g tikslumu pasverti ir masę užrašyti.
 - Išėmus išangės pakeliamąjį raumenį ir stormeninį akytkūnio raumenį, abipus ir giliau į dorsalinę pusę nuo varpos stormens yra po Kuperio arba stormeninę šlaplės liauką. Jas reikia išpjauti labai atsargiai, stengiantis nepradurti plonos kapsulės, kad neištekėtų skystis. Abi Kuperio liaukas 0,1 mg tikslumu pasverti, masę užrašyti.
 - Jeigu iš kurios nors liaukos per nekroskopiją arba skrodimą išteka skystis, tai taip pat reikėtų užrašyti.
55. Jeigu kiekvienai cheminei medžiagai įvertinti reikia atlikti didesnio kiekio gyvūnų nekroskopiją negu derėtų per vieną dieną, tyrimo pradžią galima išdėstyti dviem iš eilės dienoms, tada nekroskopija ir su ja susiję darbai paskirstomi dviem dienoms. Jeigu darbas taip paskirstomas, per vieną dieną reikėtų panaudoti pusę dozės gaunančios grupės gyvūnų.
56. Po skrodimo gyvūnų kūnus reikėtų tinkamai sutvarkyti.

ATASKAITA

Duomenys

57. Duomenys (t. y. kūno masė, pagalbinių lyties audinių masė, neprivalomi matavimai ir kitos reakcijos bei pastabos) nurodomi apie kiekvieną gyvūną ir apie kiekvieną gyvūnų grupę (visų atliktų matavimų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai). Duomenys apibendrinami lentelėse. Reikėtų nurodyti gyvūnų skaičių bandymo pradžioje, gyvūnų, kurie vykstant bandymui rasti nugaišę arba kuriems pasireiškė toksiškas poveikis, pastebėto toksiško poveikio požymiai, įskaitant jų pasireiškimo pradžią, trukmę ir stiprumą.
58. Galutinėje ataskaitoje turėtų būti pateikiama ši informacija:

Bandymą atliekanti įstaiga:

- įstaigos pavadinimas, adresas;
- tyrimo vadovas, kitas personalas ir jų pareigos tyrime;
- tyrimo pradžios ir pabaigos datos, t. y. atitinkamai pirma bandomosios cheminės medžiagos davimo diena ir paskutinė nekroskopijos diena.

Bandomoji cheminė medžiaga:

- bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) šaltinis, partijos/siuntos numeris, tapatumas, grynumas, visas tiekėjo adresas ir bandomosios (-ųjų) cheminės (-ių) medžiagos (-ų) apibūdinimas;
- fizikinė būsena ir, jei svarbu, fizikinės ir cheminės savybės;
- laikymo sąlygos, skiedimo metodas ir periodiškumas;
- visi surinkti duomenys apie stabilumą;
- visų dozių tirpalų arba suspensijų analizė.

Nešiklis:

- nešiklio apibūdinimas (pobūdis, tiekėjas ir partijos numeris);
- nešiklio pasirinkimo pagrindimas (jei nešiklis ne vanduo).

Bandomieji gyvūnai ir gyvūnų priežiūra:

- rūšis/veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;
- gyvūnų šaltinis arba tiekėjas, įskaitant visą adresą;
- pristatytų gyvūnų skaičius ir amžius;

- laikymo sąlygos (temperatūra, apšvietimas ir t. t.);
- pašarai (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis ir, jei žinoma, fitoestrogenų kiekis);
- kraikas (pavadinimas, rūšis, tiekėjas, sudėtis);
- laikymo narveliuose sąlygos ir viename narvelyje laikomų gyvūnų skaičius.

Analizės sąlygos:

- amžius kastravimo metu, aklimatizacijos po kastravimo trukmė;
- kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje (0,1 g tikslumu);
- atsitiktinės atrankos procesas, suskirstymas į nešiklio, etaloninės ir bandomosios cheminės medžiagos grupes ir narvelius;
- kiekvienos grupės gyvūnų kūno masės vidurkis ir standartinis nuokrypis padieniui per visą tyrimą;
- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;
- tai, kaip bandomoji cheminė medžiaga duodama, ir pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą;
- jeigu tiriamas antiandrogeninis poveikis, duodamas TP (dozė ir koncentracija);
- duodama bandomoji cheminė medžiaga (dozė ir koncentracija);
- dozės davimo laikas;
- nekroskopijos procedūros, įskaitant nukraujinimo, anestezavimo priemones;
- jeigu atliekama serumo analizė, reikėtų pateikti duomenis apie metodą. Pavyzdžiui, jeigu taikoma radioimunoanalizė (RIA), reikėtų aprašyti RIA procedūrą, RIA priemonių rinkinio šaltinį, priemonių rinkinio galiojimo pabaigos datas, scintiliacijų skaičiavimo procedūrą, standartizavimą.

Rezultatai:

- kiekvieno gyvūno kasdienio stebėjimo dozių davimo laikotarpiu duomenys, tarp jų:
- kūno masė (0,1 g tikslumu);
- klinikiniai požymiai (jei yra);
- visi pašarų suvartojimo matavimai arba pastabos;
- pastabos apie kiekvieno gyvūno nekroskopiją, tarp jų:
- nekroskopijos data;
- dozės gavusi gyvūnų grupė;
- gyvūno identifikavimo žyma;
- prozektorius;
- nekroskopijos ir skrodimo laikas;
- gyvūno amžius;
- galutinė kūno masė nekroskopijos metu, pažymint statistškai reikšmingą padidėjimą arba sumažėjimą;
- gyvūnų nukraujinimo ir skrodimo per nekroskopiją tvarka;
- penkių tiriamų nuo androgenų priklausomų audinių masė:
- ventralinės prostatos skilties (0,1 mg tikslumu);
- sėklinių pūslelių ir koaguliacijos liaukų su skysčiu (abiejų, 0,1 mg tikslumu);
- išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens komplekso (0,1 mg tikslumu);
- Kuperio liaukų (abiejų masė sveriant šviežias, 0,1 mg tikslumu);
- varpos galvos (masė sveriant šviežią, 0,1 mg tikslumu);

- kitų pasirinktų audinių masė, jei audiniai sveriami;
- kepenų (0,1 g tikslumu);
- inkstų (abiejų, 0,1 mg tikslumu);
- antinksčių (abiejų, 0,1 mg tikslumu);
- bendros pastabos ir komentarai.
- Serume esančių hormonų analizė, jei atliekama:
 - liuteinizuojančio hormono kiekis serume (neprivaloma – ng/serumo ml) ir
 - testosterono kiekis serume (neprivaloma – ng/serumo ml);
- bendros pastabos ir komentarai.

Duomenų apibendrinimas

Duomenis reikėtų apibendrinti lentelėje, kurioje reikėtų nurodyti kiekvienos grupės imties dydį, verčių vidurkį, standartinę vidurkio paklaidą arba standartinį nuokrypį. Lentelėse reikėtų nurodyti kūno masę nekroskopijos metu, kūno masės pokyčius nuo dozių davimo pradžios iki nekroskopijos, tiriamų pagalbinių lyties audinių masę, kitų pasirinktinai tiriamų organų masę.

Rezultatų aptarimas

Rezultatų analizė

59. Kūno ir organo, kurio nekroskopija atliekama, masę reikėtų statistiškai analizuoti, vertinant variacijų vienalytiškumą palyginti su atitinkamomis duomenų transformacijomis, jeigu to reikia. Bandomųjų grupių rezultatus reikėtų lyginti su kontrolinės grupės rezultatais taikant tokius metodus kaip ANOVA, taip pat atliekant porinių duomenų palyginimus (pvz., *Dunett* vienkryptis bandymas) ir analizę pagal statistinio skirtumo kriterijų, pvz., $p \leq 0,05$. Tas grupes, kurios įvertintos kaip statistiškai reikšmingos, reikėtų pažymėti. Tačiau „santykinės organo“ masės reikėtų vengti dėl to, kad statistinės prielaidos, kuriomis grindžiama ši duomenų manipuliacija, yra nepagrįstos.
60. Kai tiriamas androgenų agonistų veikimas, kontroline grupe turėtų būti bandymo grupė, kuriai duodamas tik neiškilis. Bandomajai cheminei medžiagai būdingas veikimo būdas gali sukelti santykinai skirtingą audinių atsaką, pavyzdžiui, trenbolonas, kurio 5 alfa-reduktazė negali veikti, daro ryškesnį poveikį išangės pakeliamajam raumeniui, stormeniniam akytkūnio raumeniui ir varpos galvai, palyginti su TP. Statistiškai reikšmingą ($p \leq 0,05$) bet kurių dviejų arba didesnio skaičiaus tiriamų nuo androgenų priklausomų audinių (ventralinės prostatos skilties, išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens, varpos galvos, Kuperio liaukų ir sėklinių pūslelių bei koaguliacijos liaukų) masės padidėjimą reikėtų laikyti teigiamu androgenų agonistų tyrimo rezultatu; turėtų pasireikšti kiek didesnis visų tiriamų audinių augimas. Jungtinių visų pagalbinių lyties organų (angl. ASO) audinių atsako įvertinimą galima atlikti taikant atitinkamą daugiavariančių duomenų analizę. Taip galima pagerinti analizę, ypač tais atvejais, kai statistiškai reikšmingas atsakas pastebimas tik viename audinyje.
61. Kai tiriamas androgenų antagonistų veikimas, kontroline grupe turėtų būti bandymo grupė, kuriai duodama etalominio androgeno (vien testosterono propionato). Bandomajai cheminei medžiagai būdingas veikimo būdas gali sukelti santykinai skirtingą audinių atsaką, pavyzdžiui, 5 alfa-reduktazės inhibitoriai, tokie kaip finasteridas, daro ryškesnį poveikį ventralinei prostatos skilčiai negu kitiems audiniams, palyginti su stipriais androgenų antagonistais, tokiais kaip flutamidas. Statistiškai reikšmingą ($p \leq 0,05$) bet kurių dviejų arba didesnio skaičiaus tiriamų nuo androgenų priklausomų audinių (ventralinės prostatos skilties, išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio akytkūnio raumens, varpos galvos, Kuperio liaukų ir sėklinių pūslelių bei koaguliacijos liaukų) masės sumažėjimą vien dėl duoto TP reikėtų laikyti teigiamu androgenų antagonistų tyrimo rezultatu; turėtų pasireikšti kiek mažesnis visų tiriamų audinių augimas. Jungtinių visų pagalbinių lyties organų audinių atsako įvertinimą galima atlikti taikant atitinkamą daugiavariančių duomenų analizę. Taip galima pagerinti analizę, ypač tais atvejais, kai statistiškai reikšmingas atsakas pastebimas tik viename audinyje.
62. Duomenis reikėtų apibendrinti lentelėje, kurioje reikėtų nurodyti kiekvienos grupės imties verčių vidurkį, standartinę vidurkio paklaidą (standartinį nuokrypį taip pat galima nurodyti) ir imties dydį. Taip pat reikėtų pateikti lenteles su kiekvieno gyvūno duomenimis. Kiekvieno gyvūno duomenų vertes, vidurkius, kontrolinių duomenų standartinę paklaidą (standartinį nuokrypį) ir variacijos koeficientą reikėtų išanalizuoti ir patikrinti, ar jie atitinka priimtinas nuoseklaus derėjimo su numatytomis anksčiau surinktų duomenų vertėmis kriterijus. Jeigu variacijos koeficientai viršija 1 lentelėje nurodytas kiekvieno organo masei nustatytų variacijos koeficientų vertes (žr. 25 ir 26 punktus), reikėtų patikrinti šiuos dalykus: gal duomenys buvo klaidingai užrašyti arba įvesti arba laboratorija dar neišmoko tiksliai atlikti nuo androgenų priklausomų audinių skrodimo ir reikalingas tolesnis mokymasis/praktika. Apskritai variacijos koeficientas (standartinis nuokrypis, padalytas iš organo masės vidurkio) yra skirtingose laboratorijose ir tyrimuose atkuriamas rodiklis. Tarp pateiktų duomenų turėtų būti bent šie: ventralinės prostatos

skilties, sėklinių pūslelių, išangės pakeliamojo raumens ir stormeninio aktykūnio raumens, Kuperio liaukų, varpos galvos, kepenų, kūno masė ir kūno masės pokytis nuo dozių davimo pradžios iki nekroskopijos. Pateikiant duomenis kūno masę taip pat galima perskaičiuoti pritaikius kovariaciją, tačiau šių duomenų nereikėtų įrašyti vietoj neperskaičiuotų duomenų. Be to, jeigu kurios nors grupės gyvūnų apyvarpė dar neatsiskyrusi, apyvarpės atsiskyrimą reikėtų registruoti ir statistiškai lyginti su kontroline grupe, tam taikant tikslųjį Fišerio (angl. *Fisher Exact*) testą.

63. Tikrinant kompiuterinių duomenų įvestis ir lyginant su pradiniais duomenų lapais tikslumui užtikrinti, organo masės vertės, kurios biologiškai yra neįmanomos arba kurios daugiau negu trimis standartiniais nuokrypiais skiriasi nuo dozę gavusios grupės vidurkio, turėtų būti atidžiai tikrinamos, kai kurias gali tekti išimti kaip galimas duomenų užrašymo klaidas.
 64. Tvirtinant tyrimo rezultatų tinkamumą svarbus rezultatų aiškinimo etapas dažnai būna tyrimo rezultatų palyginimas su EBPO variacijos koeficientų vertėmis (1 lentelė). Ankstesnius nešiklio kontrolinių grupių duomenis reikėtų saugoti laboratorijoje. Ankstesnius duomenis apie atsaką į teigiamas etalonines chemines medžiagas, pavyzdžiui, TP ir FT, taip pat reikėtų saugoti laboratorijoje. Laboratorijos taip pat gali periodiškai išbandyti atsaką į žinomus silpnus androgenų agonistus ir saugoti šiuos duomenis. Šiuos duomenis galima palyginti su turimais EBPO duomenimis, taip užtikrinant, kad pagal laboratorijos metodus atliekami tyrimai būtų pakankamai statistiškai tikslūs ir turėtų pakankamą statistinę galią.
-

1 priedėlis

SĄVOKOS

Androgeninis – sąvoka, vartojama teigiamam poveikiui nuo androgenų priklausomų audinių augimui apibūdinti.

Antiandrogeninis poveikis – tai cheminės medžiagos savybė stabdyti testosterono propionato veikimą žinduolių organizme.

Cheminė medžiaga – tai medžiaga arba mišinys.

Atsivedimo data – yra 0 postnatalinė diena.

Dozė – duodamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis. Atliekant *Hershberger* biologinį tyrimą dozė išreiškiama bandomosios cheminės medžiagos mase bandomojo gyvūno kūno masės vienetui per dieną (pvz., mg/kg kūno masės/per dieną).

Dozavimas – bendras terminas, apimantis dozės dydį, jos dažnį ir dozavimo trukmę.

Gaištantis – sąvoka, kuria apibūdinamas gaištantis gyvūnas, t. y. gyvūno, kuris netrukus nugaiš, būseną.

X postnatalinė diena – X-oji gyvenimo diena nuo atsivedimo.

Jautrumas – galimybė taikant bandymų metodą teisingai identifikuoti savybių, dėl kurių atliekamas bandymas, turinčias chemines medžiagas.

Specifiškumas – galimybė taikant bandymų metodą teisingai identifikuoti savybių, dėl kurių atliekamas bandymas, neturinčias chemines medžiagas.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Tinkamumo patvirtinimas – mokslinis procesas, kurio paskirtis – aprašyti darbo reikalavimus ir bandymų metodo apribojimus siekiant parodyti metodo patikimumą ir tinkamumą konkrečiam tikslui.

Pastaba. Šį dokumentą parengė Bandymų gairių programos sekretoriatas pagal 6-ajame EDTA darbo grupės posėdyje sudarytą susitarimą

EBPO konceptuali endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistema

1 lygmuo Suskirstymas ir prioritetų nustatymas pagal turimą informaciją	— Fizikinės ir cheminės savybės, pvz., molekulinė masė, reaktyvumas, lakumas, biologinis skaidumas — Poveikio žmogui ir gamtai būdai, pvz., gamybos mastas, išleidimas, naudojimo modeliai — Pavojingumas, pvz., turimi toksikologiniai duomenys
2 lygmuo <i>In vitro</i> assays analizės mechanistiniams duomenims surinkti	— RišimosioprieER, AR, TR receptorių afiniškumas — Transkripcijos aktyvinimas — Aromatazė ir steroidogenezė <i>in vitro</i> — Arilo angliavandenilio receptoriaus atpažinimas/rišimasis — QSAR — Parengiamoji didelio pralaidumo atranka — Skydliaukės funkcija — Žuvų hepatocitų VTG analizė — Kita (pagal poreikį)
3 lygmuo <i>In vivo</i> analizės duomenims apie vieną endokrininės sistemos mechanizmą ir apie poveikį surinkti	— Poveikiu gimdai pagrįsta analizė (susijusi su estrogenais) — Hershberger'io analizė (susijusi su androgenais) — Nereceptorinė hormonų funkcija — Kita (pvz. skydliaukė) — ŽuvųVTG (vitelogenino) analizė (susijusi su estrogenais)
4 lygmuo <i>In vivo</i> analizės duomenims apie keletą endokrininės sistemos mechanizmų ir apie poveikį surinkti	— Patobulintos EBPO gairės Nr.407 (vertinamosios baigtys, grindžiamos endokrininės sistemos mechanizmais) — Patinėlių ir patelių lytinio subrendimo analizė — Suaugusių nekastruotų patinėlių analizė — Žuvų lytinių liaukų histopatologijos analizė — Varlių metamorfozės analizė
5 lygmuo <i>In vivo</i> analizės duomenims apie keleto endokrininės sistemos ir kitų mechanizmų poveikį surinkti	— 1 kartos analizė (patobulintos TG 415)¹ — 2 kartų analizė (patobulintos TG 416)¹ — Dauginimosi atrankos bandymas (patobulintos TG 421)¹ — Jungtinis 28 dienų/dauginimosi atrankos bandymas (patobulintos TG 422)¹ ¹ Galimus patobulinius svarstys VMG-mamm — Žuvų, paukščių, amfibijų ir bestuburių gyvūnų analizė, atliekama per dalį gyvenimo ciklo arba visą ciklą (vystymosi ir dauginimosi analizė)

VMG-mamm: Bandymų su žinduoliais ir žinduolių vertinimo tinkamumo patvirtinimo valdymo grupė (angl. Validation Management Group on Mammalian Testing and Assessment)

PASTABOS DĖL KONCEPTUALIOS SISTEMOS

- 1 pastaba. Pradėti dalyvauti tyrime ir pasitraukti iš tyrimo galima visais lygmenimis; tai priklauso nuo esamų informacijos poreikių pavojaus ir rizikos vertinimo tikslais.
- 2 pastaba. 5 lygmeniu ekotoksikologija turėtų apimti vertinamąsias baigtis, kuriomis žymimi žalingo poveikio mechanizmai ir galima žala populiacijai.
- 3 pastaba. Kai daugialypis modelis apima keleto atskirų vertinamųjų baigčių tyrimą, tas modelis būtų taikomas vietoj pavienių vertinamųjų baigčių analizės.
- 4 pastaba. Kiekviena cheminė medžiaga turėtų būti vertinama kiekvienu atveju atskirai, atsižvelgiant į visą turimą informaciją ir konceptualios sistemos lygmenis.
- 5 pastaba. Kol kas šis planas apima ne viską. 3, 4 ir 5 lygmenyse jis apima analizę, kurią vykdyti jau galima arba kurios tinkamumas dar tvirtinamas. Antrosios grupės analizė įtraukta preliminariai. Kai ji bus išplėta ir patvirtinta, ja planas bus oficialiai papildytas.
- 6 pastaba. Nereikėtų suprasti, kad 5 lygmuo apima tik baigiamuosius bandymus. Šiuo lygmeniu įtraukiami bandymai laikomi padeinančiais įvertinti bendrą pavojingumą ir riziką.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 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 N° 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 5α-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and SAFETY, Monograph Series on Testing and Assessment N° 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 N° 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 J* 26:413–422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J* 26:1306–1314.
- (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 myotrophic 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. Žr. The dissection guidance provided to the laboratories, II skyrių: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- (22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. 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) 2010 m. rugsėjo 22 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2010/63/ES dėl mokslo tikslais naudojamų gyvūnų apsaugos (OL L 276, 2010 10 20, p. 33).
- (27) Šie šio priedo skyriai:
- B.1 bis „Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą. Fiksuotųjų dozių metodas“
- B.1 tris „Ūmus toksiškumas per virškinamąjį traktą. Ūmaus toksiškumo klasės metodas“.

B.56. IŠPLĖSTINIS TOKSIŠKUMO VIENOS KARTOS DAUGINIMUISI BANDYMAS

IVADAS

- Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. OECD Test Guideline (TG)) Nr. 443 (2012). Jis parengtas pagal Tarptautinio gyvybės mokslų instituto (angl. ILSI) Sveikatos ir aplinkos mokslų instituto (angl. HESI) Žemės ūkio cheminių medžiagų saugos įvertinimo (angl. ASCA) techninio komiteto pasiūlymą dėl vienos kartos dauginimosi bandymo, išplėsto iki F₁ gyvenimo etapo, paskelbtą Cooper et al., 2006 (1). Bandymo modelis buvo patobulintas ir išsamiau paaiškintas siekiant, kad jis būtų lankstesnis ir būtų pabrėžta, jog bandymą pradedant yra svarbu remtis turimais duomenimis, o vėliau stebint gyvus gyvūnus bandymą pakreipti reikiama linkme ir pritaikyti pagal poreikius. Pagal šį bandymų metodą pateikiamas išsamus aprašas, kaip vykdomas Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas. Pagal bandymų metodą aptariamos trys F₁ gyvūnų kohortos:
- 1 kohorta: vertinamos dauginimosi/vystymosi vertinamosios baigtys; šį pogrupį galima išplėsti – įtraukti F₂ kartą;
- 2 kohorta: vertinamas galimas sąveikos su chemine medžiaga poveikis nervų sistemos vystymuisi;
- 3 kohorta: vertinamas galimas sąveikos su chemine medžiaga poveikis imuninės sistemos vystymuisi.

2. Sprendimai, ar vertinti antrą gyvūnų kartą, ar atsisakyti neurotoksiškumo vystymuisi vertinimo kohortos ir (arba) imunotoksiškumo vystymuisi vertinimo kohortos, priimami pagal turimas žinias apie vertinamą cheminę medžiagą ir pagal įvairių reguliavimo institucijų poreikius. Bandymų metodo tikslas – surinkti išsamius duomenis apie tai, kaip būtų galima atlikti bandymą ir kaip reikėtų vertinti kiekvieną gyvūnų kohortą.
3. Rėmimosi vidaus kriterijais priimant sprendimus dėl antros gyvūnų kartos tvarka, skirta toms reguliavimo institucijoms, kurios tokius kriterijus taiko, aptarta EBPO Rekomendaciniame dokumente (angl. *Guidance Document*) Nr. 117 (39).

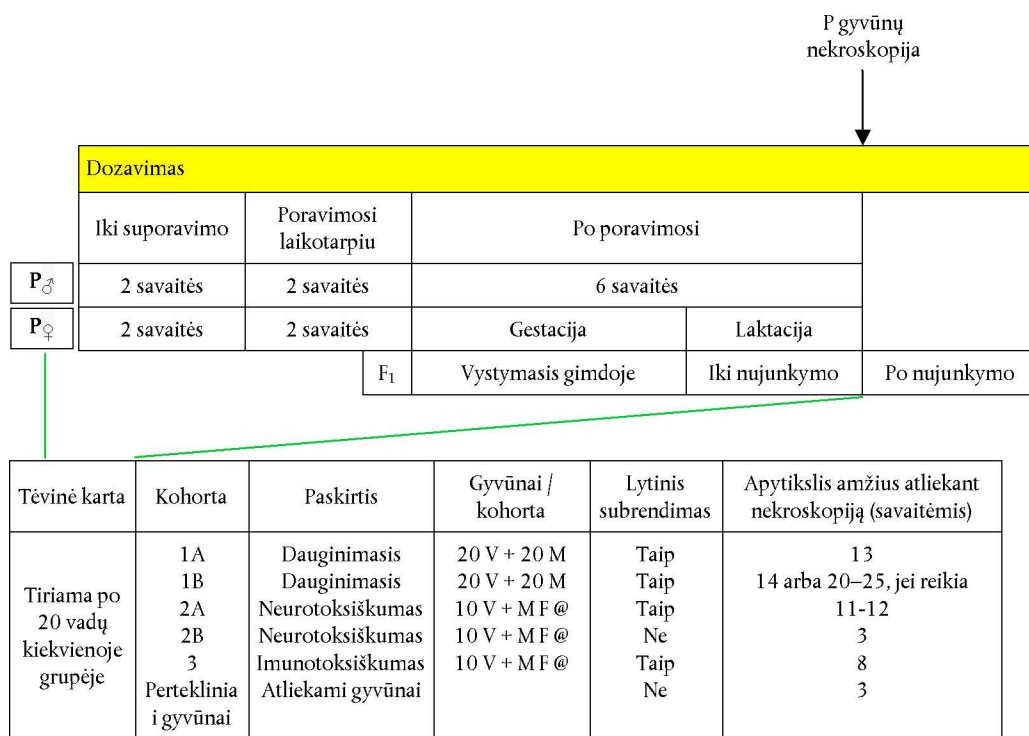
PRADINIAI ASPEKTAI IR TIKSLAI

4. Pagrindinis išplėstinio toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymo tikslas – įvertinti tam tikrus per kitokio pobūdžio toksiškumo tyrimus nevertinamus gyvenimo etapus ir išbandyti poveikį, kurį gali sukelti sąlytis su chemine medžiaga prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiu. Kai tiriamos dauginimosi vertinamosios baigtys, yra numatyta, kad, norint nustatyti poveikį patinėlių ir patelių dauginimosi organams, pirmiausia pasinaudojama informacija, gauta iš kartotinių dozių tyrimų (įskaitant toksiškumo dauginimosi sistemai atrankos tyrimus, pvz. žr. EBPO Bandymų gaires Nr. 422 (32)) arba trumpalaikių endokrininę sistemą galimai ardančių medžiagų atrankos analizių (pvz., Poveikiu gimdai pagrįstos analizės – bandymų metodas B.54 (36) ir *Hershberger* analizės – bandymų metodas B.55 (37)), jei tokios informacijos turima. Be kita ko gali būti atliekama: patinėliams – rujos ciklų spermatogenezė (sėklidžių histopatologija), patelėms – skaičiuojami folikulai/vertinamas oocitų subrendimas, kiaušidžių vientisumas (histopatologija). Taigi išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas padeda iširti dauginimosi vertinamąsias baigtis, kurioms įvertinti reikalinga patinėlių ir patelių sąveika, patelės su apvaisintais kiaušinėliais, patelės su palikuonimis ir F_1 karta iki šios kartos gyvūnų lytinio subrendimo (išsamesnės informacijos apie šį bandymų metodą yra pateikta EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 151 (40)).
5. Šis bandymų metodas yra skirtas įvertinti, kokį poveikį cheminės medžiagos daro vystymuisi prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiu, taip pat nuodugniai įvertinti sisteminių toksiškumą vaikingoms ir žindančioms patelėms bei jauniems ir suaugusiems palikuonims. Išsami pagrindinių vystymosi vertinamųjų baigčių, pavyzdžiui, palikuonių gyvybingumo, ką tik gimusių jauniklių sveikatos, išsivystymo atsivedant, fizinio ir funkcinio vystymosi iki subrendimo, analizė turėtų padėti nustatyti konkrečius tirtinus palikuonių organus. Be to, atliekant bandymą bus gauta ir (arba) patvirtinta informacija apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį suaugusių patinėlių ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir funkcionavimui. Konkrečiai nagrinėjami šie parametrai (bet ne tik): lytinių liaukų funkcija, rujos ciklas, spermos brendimas antiseklidžiuose, elgsena poruojantis, apvaisinimas, gestacija, atsivedimas ir laktacija. Be to, informacija, gauta atliekant neurotoksiškumo ir imunotoksiškumo vystymuisi vertinimus, bus apibūdintas galimas poveikis toms sistemoms. Per šiuos bandymus gauti duomenys turėtų padėti nustatyti nepastebėto neigiamo poveikio dozės ribas (angl. NOAEL), žemiausias pastebėto neigiamo poveikio dozės ribas (angl. LOAEL) ir (arba) etalonines dozes pagal įvairias vertinamąsias baigtis; dar šiuos duomenys būtų galima panaudoti per ankstesnius kartotinių dozių tyrimus nustatytam poveikiui apibūdinti ir (arba) tolesniems bandymams pakreipti reikiama linkme.
6. Protokolas schematiškai pavaizduotas 1 pvz., Kelioms lytiškai subrendusių patinėlių ir patelių grupėms nepertraukiamai duodamos skirtingos bandomosios cheminės medžiagos dozės. Šiai tėvinei (P) kartai dozės duodamos nustatytą laikotarpį iki poravimosi (šis laikotarpis pasirenkamas pagal turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, bet turi būti ne trumpesnis kaip dvi savaitės) ir dvi savaites per poravimosi laikotarpį. P patinėliai toliau tiriami bent iki F_1 nujunkymo. Dozės jiems reikėtų duoti ne trumpiau kaip 10 savaičių. Dozės galima duoti ir ilgiau, jeigu poveikį dauginimuisi reikia išsiaiškinti tiksliau. P patelėms dozės nepertraukiamai duodamos gestacijos ir laktacijos laikotarpiais iki bandymo nutraukimo, kai jų vados nujunkomos (t. y. dozės duodamos 8–10 savaičių). F_1 palikuonys toliau gauna bandomosios cheminės medžiagos dozes nuo nujunkymo iki brandos. Jeigu vertinama antra karta (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 117 (39)), F_1 palikuonims dozės duodamos iki F_2 nujunkymo arba iki bandymo nutraukimo.
7. Visi gyvūnai stebimi kliniškai ir atliekami patologiniai tyrimai toksiškumo požymiams nustatyti, ypač daug dėmesio skiriant patinų ir patelių dauginimosi sistemų vientisumui ir funkcionavimui bei palikuonių sveikatai, augimui ir vystymuisi. Nujunkyti ir atrinkti palikuonys suskirstomi į specialius pogrupius (1–3 kohortas, žr. 33, 34 punktus ir 1 schemą) ir tiriami toliau; be kitų dalykų, tiriamas lytinis subrendimas, dauginimosi organų vientisumas ir funkcijos, neurologinės ir elgsenos vertinamosios baigtys, imuninės sistemos funkcijos.
8. Atliekant bandymą reikėtų vadovautis pagrindiniais principais ir prielaidomis, išdėstytomis EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 19 *On the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations* (34).

9. Kai bus atlikta pakankamai daug bandymų, kad būtų galima patikrinti šio naujo bandymų modelio poveikį, bandymų metodas bus persvarstytas ir prireikus patikslintas atsižvelgiant į įgytą patirtį.

1 schema

Išplėstinio toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymo schema



@ vienas iš vados ir iš viso 20-ies vadų reprezentacinis skaičius, jei įmanoma

METODO APIBŪDINIMAS/PASIRENGIMAS BANDYMU

Gyvūnai

Gyvūnų rūšių ir veislių parinkimas

10. Rūšių pasirinkimą toksiškumo dauginimuisi bandymui atlikti reikėtų kruopščiai apgalvoti atsižvelgiant į visą turimą informaciją. Tačiau, atsižvelgiant į bendrų duomenų kiekį ir galimybes palyginti su bendrojo toksiškumo bandymais, dažniausiai pasirenkama gyvūnų rūšis yra žiurkės, tad pagal šį bandymų metodą pateikiami kriterijai ir rekomendacijos yra skirti būtent šiai rūšiai. Jei naudojama kita rūšis, pasirinkimas turėtų būti pagrįstas ir turėtų būti padaromi atitinkami reikalingi protokolo pakeitimai. Neturi būti naudojamos mažo vaisingumo veislės arba veislės, kurioms savaime pasireiškia vystymosi defektai.

Amžius, kūno masė ir įtraukimo kriterijai

11. Reikėtų naudoti sveikus, bandymuose dar nenaudotus tėvinius gyvūnus. Reikėtų tirti ir patinėlius, ir patėles; patėlės turėtų būti dar neturėjusios palikuonių ir nevaikingos. Pradedant duoti dozes P gyvūnai turėtų būti lytiškai subrendę, panašios masės (kaip ir kiti tos lyties gyvūnai), poravimo metu panašaus amžiaus (apie 90 dienų), reprezentatyvūs tos rūšies ir veislės gyvūnų, su kuriais atliekamas bandymas, pavyzdžiai. Atvežtiems gyvūnams leidžiama aklimatizuotis ne trumpiau kaip 5 dienas. Gyvūnai atsitiktine tvarka suskirstomi į kontrolinę ir bandomąją grupes taip, kad grupių gyvūnų kūno masės vidurkis būtų panašus (t. y. $\pm 20\%$ vidurkio).

Laikymo ir šėrimo sąlygos

12. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turėtų būti $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}$). Santykinė drėgmė turėtų būti 30–70 %, idealus intervalas – 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis ir jo seka per parą turėtų būti 12 h šviesos ir 12 h tamsos.

Galima naudoti standartinius laboratorinių gyvūnų pašarus, geriamojo vandens kiekis neribojamas. Reikėtų atkreipti dėmesį į fitoestrogenų kiekį pašaruose, nes didelis fitoestrogenų kiekis pašaruose gali paveikti kai kurias dauginimosi vertinamąsias baigtis. Rekomenduojama naudoti standartinius, žinomos sudėties pašarus, kurių sudėtyje būtų kuo mažiau estrogeninių cheminių medžiagų (2) (30). Pašaro pasirinkimui gali turėti įtakos būtinybė tinkamai įmaišyti bandomąją cheminę medžiagą, duodamą pagal šį metodą. Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos kiekį, vienalytiškumą ir stabilumą nešiklyje. Reikėtų reguliariai tikrinti, ar pašaruose ir geriamajame vandenyje nėra teršalų. Kiekvienos per tyrimą naudojamo pašaro partijos pavyzdžius reikėtų laikyti reikiamomis sąlygomis (pvz., užšaldžius – 20 °C temperatūroje), kol bus baigta rengti ataskaita tam atvejui, jeigu pašaro sudedamąsias dalis dar reikėtų išsamiau analizuoti.

13. Gyvūnus reikėtų laikyti mažomis tos pačios lyties ir tokias pačias dozes gaunančių gyvūnų grupėmis. Siekiant išvengti galimų sužalojimų, gyvūnus galima laikyti atskirai (pvz., patinus po poravimosi). Poruojama turėtų būti šiam tikslui pritaikytuose narveliuose. Pasitvirtinus susiporavimui, patelės, kurios, kaip manoma, yra apvaisintos, laikomos po vieną atsivedimo arba veisimo narveliuose ir yra aprūpinamos tinkamomis ir nustatytomis gūžtos sukimo medžiagomis. Vados jaunikliai laikomi kartu su motinomis iki atjunkymo. F_1 gyvūnai laikomi mažomis grupėmis su tos pačios lyties ir dozes gaunančios grupės gyvūnais nuo nujunkymo iki bandymo nutraukimo. Moksliškai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai. Fitoestrogenų kiekis pasirinktame kraike turėtų būti kuo mažesnis.

Gyvūnų skaičius ir ženklimas

14. Paprastai kiekvienoje dozės gaunančioje ir kontrolinėje grupėje turėtų būti pakankamas poruojamų gyvūnų porų skaičius, kad vienoje dozės grupėje būtų gauta bent 20 vaikingų patelių. Taip siekiama užtikrinti pakankamą vaikingų patelių skaičių, kad būtų galima prasmingai įvertinti galimą cheminės medžiagos poveikį vaisingumui, gestacijai ir P kartos patelių elgesiui, taip pat F_1 palikuonių augimui ir vystymuisi nuo apvaisinimo iki subrendimo. Nepavykus gauti norimo vaikingų patelių skaičiaus (t. y. 20), bandymas nebūtinai bus netinkamas ir turi būti vertinamas kiekvienu atveju atskirai, atsižvelgiant į galimą priežastinį ryšį su bandomąja chemine medžiaga.
15. Prieš pradedant duoti dozes kiekvienas P gyvūnas paženklinamas unikaliu numeriu. Jeigu iš ankstesnių laboratorijos duomenų matyti, kad reikšmingai patelių daliai rujos ciklas gali būti ne toks kaip įprasta (4 ar 5 dienų trukmės), rekomenduojama prieš pradedant duoti dozes įvertinti rujos ciklą. Taip pat, siekiant užtikrinti, kad bent 20 patelių kiekvienoje grupėje rujos ciklas tyrimo pradžioje būtų toks, kaip įprasta (4 arba 5 dienos), grupę galima papildinti. Visi F_1 palikuonys juos atsivedus yra paženklinami unikalia žyma ir pirmą kartą patikrinami 0 arba 1-ą postnatalinę dieną (PND). Visą tyrimą reikėtų saugoti duomenis apie tai, iš kokios vados yra paimtas kiekvienas F_1 ir F_2 (jei reikia) gyvūnas.

Bandomoji cheminė medžiaga:

Turima informacija apie bandomąją cheminę medžiagą

16. Su esama informacija svarbu susipažinti priimant sprendimus dėl dozių davimo būdo, nešiklio pasirinkimo, gyvūnų rūšių parinkimo, dozės dydžio pasirinkimo ir galimo dozavimo grafiko keitimo. Todėl planuojant išplėstinį toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymą reikia atsižvelgti į visą svarbią turimą informaciją apie bandomąją cheminę medžiagą, t. y. fizikines ir chemines savybes, toksikokinetinius duomenis (tarp jų – konkrečioms rūšims būdingą metabolizmą), toksikodinamines savybes, struktūros ir veikimo sąsajas (angl. SAR), *in vitro* metabolinius procesus, ankstesnių toksiškumo tyrimų rezultatus ir svarbią informaciją apie struktūriniu požiūriu analogiškas medžiagas. Pirminės informacijos apie absorbciją, pasiskirstymą, metabolizmą ir šalinimą (angl. ADME) bei biologinį kaupimą galima gauti iš cheminės struktūros, fizikinių ir cheminių duomenų, jungimosi su plazmos baltymais masto ir toksikokinetinių (TK) tyrimų, o toksiškumo tyrimų rezultatai suteikia papildomos informacijos, pvz., apie NOAEL, metabolizmą arba metabolizmo indukciją.

Toksikokinetinių duomenų vertinimas

17. Nors toksikokinetiniai duomenys iš anksčiau atliktų dozių dydžio intervalo nustatymo arba kitų tyrimų nėra privalomi, jie itin naudingi planuojant tyrimo struktūrą, pasirenkant dozės dydį ir aiškinant rezultatus. Ypač naudingi tie duomenys, kuriais: 1) patvirtinamas besivystančio vaisiaus ir jauniklio sąlytis su bandomąja chemine medžiaga (arba atitinkamais metabolitais), 2) suteikiama duomenų apie vidinę dozimetriją ir 3) įvertinama galima nuo dozės priklausoma kinetinių procesų saturacija. Į papildomus toksikokinetinius duomenis, pavyzdžiui,

metabolitų ypatumus, koncentraciją per tam tikrą laiką ir kt., taip pat reikėtų atsižvelgti, jei šių duomenų turima. Atliekant pagrindinį tyrimą taip pat galima rinkti papildomus toksikokinetinius duomenis, jeigu tai netrukdo rinkti ir aiškinti pagrindinio tyrimo vertinamųjų baigčių.

Apskritai, planuojant išplėstinį toksikumo vienos kartos dauginimuisi tyrimą būtų naudingi šie TK duomenys:

- gestacijos laikotarpio pabaigoje (pvz., 20-ą gestacijos dieną) – motinos ir vaisiaus kraujo;
- laktacijos laikotarpio viduryje (10-ą PND) – motinos ir jauniklio kraujo ir (arba) pieno;
- ankstyvuoju laikotarpiu po atjunkymo (pvz., 28-ą PND) – nujunkytų jauniklių kraujo mėginių.

Nustatant konkrečias analites (pvz., pagrindinę cheminę medžiagą ir (arba) metabolitus) ir atrankos schemą reikėtų vadovautis lankstumo principu. Pavyzdžiui, mėginių skaičius ir surinkimo laikas nustatytą mėginių surinkimo dieną priklausys nuo sąlyčio būdo ir iš anksto turimų žinių apie toksikokinetines savybes nevaikingų gyvūnų organizme. Bandomąją medžiagą dedant į pašarus užtenka nustatyti vieną laiką, kada mėginiai surenkami kiekvieną iš tų dienų; jei dozės duodamos per zondą, gali tekti nustatyti ne vieną papildomą mėginių surinkimo laiką, kad vidinių dozių intervalo įvertis būtų tikslesnis. Tačiau matuoti medžiagos koncentracijos pokytį laiko atžvilgiu visą tam tikrą kraujo ėmimo dieną nebūtina. Jei reikia, tiriant vaisius ir naujagimius vienos lyties ir vados gyvūnų kraują galima sujungti.

Davimo būdas

18. Pasirenkant davimo būdą reikėtų atsižvelgti į tai, kuris būdas yra artimiausias žmogaus sąlyčio su ta medžiaga būdai (-ams). Nors pagal protokolą yra numatyta bandomąją cheminę medžiagą duoti su pašaru, protokolą galima pakeisti ir bandomąją cheminę medžiagą duoti kitais būdais (su geriamuoju vandeniu, per zondą, kvėpavimo takus, odą) atsižvelgiant į cheminės medžiagos savybes ir tai, kokia informacija yra reikalinga.

Nešiklio pasirinkimas

19. Prireikus bandomoji cheminė medžiaga tirpinama tinkamame nešiklyje arba paruošiama jos suspensija. Rekomenduojama visų pirma apsvarstyti galimybę, jei tik įmanoma, naudoti vandeninį tirpalą ar suspensiją; jei neįmanoma, tada – aliejinį tirpalą ar suspensiją (pvz., kukurūzų aliejuje). Jei nešiklis yra ne vanduo, turi būti žinomos jo toksikumo savybės. Reikėtų vengti naudoti nešiklius, kuriems yra būdingas toksikumas (pvz., acetoną, DMSO). Reikėtų nustatyti bandomosios cheminės medžiagos stabilumą nešiklyje. Jei dozių ruošimui palengvinti naudojamas nešiklis arba kitas priedas, reikėtų atsižvelgti į tokias jo charakteristikas: poveikį bandomosios cheminės medžiagos absorbcijai, pasiskirstymui, metabolizmui arba sulaikymui; poveikį bandomosios cheminės medžiagos cheminėms savybėms, dėl kurio gali pasikeisti jos toksikumas; poveikį maisto ar vandens suvartojimui arba gyvūnų imtimui.

Dozės pasirinkimas

20. Paprastai per tyrimą reikėtų tirti bent trijų dydžių dozes ir vykdyti lygiagrečią kontrolę. Pasirinkdamas reikiamas dozes dydžius tyrėjas turėtų atsižvelgti į visą turimą informaciją, taip pat į informaciją apie dozavimą per ankstesnius tyrimus, toksikokinetinius duomenis, gautus tiriant vaikingus ir nevaikingus gyvūnus, informaciją apie perdavimo laktacijos laikotarpiu mastą ir numatomą žmogaus sąlytį su medžiaga. Jeigu turima toksikokinetinių duomenų, iš kurių matyti, kad toksikokinetinių procesų saturacija priklauso nuo dozės dydžio, reikėtų imtis atsargumo priemonių ir vengti didelių dozių, kurios akivaizdžiai sukelia saturaciją, – žinoma, jeigu žmogaus sąlyčio su medžiaga lygis bus daug žemesnis už saturacijos tašką. Tokiais atvejais didžiausia dozė turėtų būti tokia, kuriai esant fiksuojamas perėjimo prie tiesinio toksikokinetinio modelio (tiesinės toksikokinetinės priklausomybės) perlanko taškas, arba dozė, esanti virš perlanko taško.
21. Jeigu reikiamų toksikokinetinių duomenų nėra, dozės dydį reikėtų pasirinkti pagal poveikio toksikumą, nebent yra apribojimų dėl bandomosios cheminės medžiagos fizikinio ir (arba) cheminio pobūdžio. Jeigu dozės dydis pasirenkamas pagal toksikumą, didžiausia dozė pasirenkama tokia, kad būtų sukeltas tam tikras toksinis poveikis, bet kad gyvūnai nenugaištų ir nepatirtų didelių kančių.
22. Kitus dozes dydžius reikėtų pasirinkti mažėjančia tvarka taip, kad būtų pastebėtas kiekvienas su doze susijęs atsakas ir būtų nustatyta nepastebėto neigiamo poveikio riba (NOAEL) arba aptikimo ribai artimas dozės dydis, kad pagal tai būtų galima nustatyti etaloninę dozę jautriausiai (-ioms) vertinamajai (-osioms) baigčiai (-ims). Kad intervalai tarp NOAEL ir LOAEL nebūtų dideli, dažniausiai optimalūs intervalai būna tokie, kuriais dozės didėja dukart arba keturiskart. Užuoat palikus labai didelius intervalus tarp dozių (pvz., kai jos skiriasi daugiau kaip 10 kartų), geriau įtraukti ketvirtą bandymo grupę.

23. Kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir bandomieji gyvūnai, išskyrus tai, kad jie neveikiami bandomąja chemine medžiaga. Ši grupė turėtų būti medžiagos negaunanti kontrolinė grupė arba nešiklį gaunanti kontrolinė grupė, jei bandomajai cheminei medžiagai duoti naudojamas nešiklis. Jei naudojamas nešiklis, kontrolinė grupė turėtų gauti nešiklio kiekį, atitinkantį didžiausią naudojamą nešiklio tūrį.

Ribinis bandymas

24. Jeigu atliekant kartotinių dozių tyrimus negauta duomenų, kad ne mažiau kaip 1 000 mg/kg kūno masės/per dieną dozė yra toksiška, arba jeigu, remiantis duomenimis apie struktūrinį ir (arba) metabolinių požymių giminių cheminių medžiagų metabolines savybes, įskaitant *in vivo/in vitro* panašumą, toksiškumo neturėtų būti, kelių dydžių dozių tyrimo gali nereikėti. Tokiais atvejais išplėstinį toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymą galima atlikti su viena kontroline grupe ir viena ne mažiau kaip 1 000 mg/kg kūno masės/per dieną dydžio dozės grupe. Tačiau jeigu naudojant tokį dozės dydį pasireiškia toksiškumo dauginimuisi arba vystymuisi požymių, reikės toliau atlikti bandymus naudojant mažesnes dozes, kad būtų nustatytas NOAEL. Šios nuostatos dėl bandomos dozės ribų taikomos tik tada, kai, atsižvelgiant į žmogaus sąlytį su medžiaga, didesnių dozių naudoti nereikia.

PROCEDŪRA

Palikuonių veikimas

25. Geriausia dozės duoti kartu su pašaru. Reikėtų atkreipti dėmesį į tai, kad darant bandymus su zonu jaunikliai dažniausiai gauna bandomosios cheminės medžiagos tiesiogiai su pienu tol, kol, juos nujunkius, dozės jiems pradedamos duoti tiesiogiai. Jeigu bandymai daromi medžiagą dedant į pašarą arba geriamąjį vandenį, jaunikliai papildomai gauna bandomosios cheminės medžiagos tiesiogiai, kai paskutinę laktacijos laikotarpio savaitę pradeda ęsti patys. Jeigu bandomosios cheminės medžiagos į pieną patenka nedaug arba jeigu trūksta duomenų, kad palikuonys yra nepertraukiamai veikiami, galima svarstyti galimybę keisti tyrimo modelį. Tokiais atvejais, remiantis turima toksikokinetine informacija, toksiškumo palikuonims arba biologinių žymeklių pokyčių duomenimis (3) (4), reikėtų apsvarstyti galimybę laktacijos laikotarpiu dozės jaunikliams duoti tiesiogiai. Prieš pradedant tyrimus, per kuriuos dozės žindomiems jaunikliams būtų duodamos tiesiogiai, reikėtų atidžiai įvertinti naudą ir trūkumus (5).

Dozių davimo tvarkaraštis ir dozių davimas

26. Tam tikros informacijos apie rujanų ciklus, patinėlių ir patelių dauginimosi trakto histopatologinę ir sėklidžių ir (arba) antiseklidžių spermos analizę galima gauti iš ankstesnių atitinkamos trukmės kartotinės dozės toksiškumo tyrimų. Todėl atliekant išplėstinį toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymą bandymo trukmė iki suporavimo pasirenkama tokia, kad būtų galima nustatyti poveikį funkciniais pokyčiams, kurie gali sutrikdyti elgseną poravimosi metu ir vaisingumą. Dozės iki poravimosi turėtų būti duodamos pakankamai ilgai, kad P patelės ir patinėliai būtų veikiami pastoviosios būsenos sąlygomis. Dažniausiai 2 savaitės iki poravimosi dozių davimo trukmė abiem lytims yra laikoma pakankama. Kai tiriamos patelės, šis laikotarpis apima 3–4 rujanų ciklus ir turėtų būti pakankamas neigiamam poveikiui rujanų ciklškumui nustatyti. Kai tiriami patinėliai, tokia trukmė atitinka bręstančių spermatozoidų tranzito į antiseklidžius laikotarpį ir turėtų padėti nustatyti poveikį spermai jai pasigaminus sėklidėse (paskutiniams spermos išskyrimo ir brendimo antiseklidžiuose etapais). Iki bandymo nutraukimo, kai yra suplanuota atlikti sėklidžių ir antiseklidžių histopatologinę ir spermos parametrų analizę, P ir F₁ gyvūnai bus turėję sąlytį su medžiaga bent vieną išsą spermatogeninį ciklą ((6) (7) (8) ir EBPO Rekomendacinis dokumentas Nr. 151 (40)).
27. Patinėlių sąlyčio su medžiaga scenarijus iki poravimosi galima keisti, jeigu per ankstesnius tyrimus buvo aiškiai nustatytas toksiškumas sėklidėms (pablogėjo spermatogenezė) arba pasireiškė poveikis spermos vientisumui ir funkcionalumui. Panašiai patelių atveju – turint duomenų apie bandomosios cheminės medžiagos poveikį rujanų ciklui, kartu ir lytiniam jautrumui, gali būti pagrįsta rinktis kitokius sąlyčio su medžiaga iki poravimosi scenarijus. Ypatingais atvejais galima leisti dozės P patelėms pradėti duoti tik jau gavus teigiamus tepinėlio reakcijos į spermą rezultatus (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)).
28. Nustačius dozių davimo iki poravimosi trukmę, gyvūnams bandomosios cheminės medžiagos duodama nepertraukiamai po 7 dienas per savaitę iki pat nekroskopolijos. Visiems gyvūnams dozės turėtų būti duodamos tokiu pat metodu. Dozės duodamos 2 savaites poravimosi laikotarpiu ir P patelėms – gestacijos bei laktacijos laikotarpiu iki bandymo nutraukimo, kai jaunikliai nujunkomi. Patinėliams dozės duodamos tokiu pačiu būdu iki bandymo nutraukimo, kai F₁ gyvūnai nujunkomi. Nekroskopolija pirmiau atliekama patelėms, jų nekroskopoliją reikėtų atlikti tą pačią ar panašią laktacijos laikotarpio dieną. Patinėlių nekroskopoliją galima išdėstyti didesniai dienų skaičiui

pagal laboratorijos galimybes. Jeigu laktacijos laikotarpiu dozės nepradėtos duoti tiesiogiai, jas reikėtų pradėti tiesiogiai duoti pasirinktiems F_1 patinėliams ir patelėms nujunkymo laikotarpiu ir toliau duoti iki suplanuotos nekroscopijos dienos pagal kohortos gyvūnų paskirstymo tvarką.

29. Jei cheminės medžiagos duodamos su pašarais ar geriamuoju vandeniu, svarbu garantuoti, kad naudojamas bandomosios cheminės medžiagos kiekis netrikdytų normalios mitybos arba gėrimo pusiausvyros. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama su pašaru, jos dozė gali būti išreiškiama kaip pastovi koncentracija pašaruose (ppm) arba kaip pastovus dozės dydis pagal gyvūno kūno masės vienetą; pasirinktą variantą reikėtų nurodyti.
30. Kai bandomoji cheminė medžiaga duodama per zondą, vienu metu duodamo skysčio tūris paprastai neturėtų viršyti 1 ml/100 g kūno masės (0,4 ml/100 g kūno masės yra didžiausias kiekis naudojant aliejų, pvz., kukurūzų). Išskyrus dirginančias arba šėdinančias chemines medžiagas, kurios esant didesnei koncentracijai turi sunkesnę poveikį, bandomojo tirpalo tūrio nepastovumas turi būti kiek įmanoma sumažintas keičiant koncentraciją taip, kad visų dozių tūris būtų pastovus. Dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną panašiu laiku. Dozė kiekvienam gyvūnui paprastai turėtų būti nustatoma atsižvelgiant į patį paskutinį jo svėrimą; suaugusių patinėlių ir suaugusių nevaikinių patelių dozė koreguojama bent kas savaitę, vaikinių patelių ir $F1$ gyvūnų iki atjunkymo ir 2 savaites po atjunkymo – kas dvi dienas. Jeigu iš toksikokinetinių duomenų matyti, kad bandomosios cheminės medžiagos per placentą perduodama mažai, per zondą duodamos dozės dydį paskutinę gestacijos savaitę gali tekti pakoreguoti, kad patelei nebūtų duodama pernelyg toksiška dozė. Patelėms, kurioms dozės duodamos per zondą arba kitu būdu, kurį taikant gyvūnus reikia liesti, jauniklių atsivedimo dieną dozės duoti nereikėtų; tą dieną bandomosios cheminės medžiagos geriau neduoti, kad nebūtų sutrikdytas jauniklių atsivedimo procesas.

Poravimas

31. Kiekviena P patelė uždaroama į narvelį su vienu atsitiktine tvarka atrinku ir nesusijusiu tą pačią dozę gaunančiu patinėliu (1:1 poravimas) tol, kol jie susiporuoja, arba 2 savaitėms. Jeigu patinėlių nepakanka, pavyzdžiui, dėl to, kad patinėliai nugaišo iki suporavimo, tada jau suporuotas (-i) patinėlis (-iai) poruojamas (-i) (1:1) su antra (kitomis) patele (-ėmis) taip, kad visos patelės būtų suporuotos. 0 gestacijos diena apibrėžiama kaip diena, kurią pasitvirtina susiporavimo faktas (randama spermos arba makšties kamštis). Gyvūnus reikėtų iš karto atskirti, kai tik pastebima, kad gyvūnai susiporavo. Jeigu per 2 savaites gyvūnai nesusiporuoja, juos reikėtų atskirti ir nebebandyti jų suporuoti. Duomenyse suporuotos poros turi būti aiškiai pažymėtos.

Vados dydis

32. Praėjus 4 dienoms po atsivedimo, kiekvienos vados dydis gali būti koreguojamas pašalinant perteklinį prieauglį atrankos būdu taip, kad kiekvienoje vadoje, kiek tai yra įmanoma, liktų penki patinėliai ir penkios patelės. Selektyvus jauniklių pašalinimas, pvz., pagal kūno masę, nepriimtinas. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po penkis kiekvienos lyties palikuonis, priimtinas dalinis palikuonių skaičiaus koregavimas (pvz., šeši patinėliai ir keturios patelės).

Jauniklių atrinkimas tyrimams po nujunkymo (žr. 1 schemą)

33. Nujunkymo metu (apie 21 PND) iš visų turimų vadų po 20 jauniklių paskiriama į kiekvienos dozės grupę ir kontrolinę grupę ir laikomi tolesniems tyrimams iki lytinės brandos (nebent dar prieš tai reikėtų atlikti kokius nors tyrimus). Jaunikliai atrinkami atsitiktine tvarka, išskyrus tai, kad neturėtų būti imami akivaizdžiai silpniausi jaunikliai (gyvūnai, kurių kūno masė yra daugiau negu dviem standartiniais nuokrypiais mažesnė už atitinkamos vados jauniklių masės vidurkį), nes jie greičiausiai nėra reprezentatyvūs dozės gaunančios grupės pavyzdžiai.

21 PND atrinkti F_1 jaunikliai atsitiktine tvarka paskirstomi į tris gyvūnų kohortas:

1 kohorta (1A ir 1B) = toksiškumo dauginimuisi/vystymuisi bandymas;

2 kohorta (2A ir 2B) = neurotoksiškumo vystymuisi bandymas;

3 kohorta = imunotoksiškumo vystymuisi bandymas.

1A kohorta: po vieną patinėlį ir vieną patelę iš vados grupėje (20 kiekvienos lyties grupėje): prioritetinga atranka pirminiam poveikio dauginimosi sistemai ir bendrojo toksiškumo įvertinimui.

1B kohorta: po vieną patinėlį ir vieną patelę iš vados grupėje (po 20 kiekvienos lyties grupėje): prioritetinga atranka tolesniam dauginimosi sistemos veikimo vertinimui poruojant F_1 gyvūnus, kai šie įvertinami (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 117 (39)), ir papildomiems histopatologiniams duomenims surinkti tais atvejais, kai įtariama, jog medžiaga yra toksiška dauginimosi arba endokrininei sistemai arba kai 1A pogrupio rezultatai yra nevienareikšmiai.

2A kohorta: iš viso 20 jauniklių grupėje (po 10 patinėlių ir 10 patelių grupėje; po vieną patinėlį arba vieną patelę iš vados) yra paskiriami neurobihevioristiniam bandymui atlikti, po kurio atliekamas jau suaugusių gyvūnų neurohistopatologinis tyrimas.

2B kohorta: iš viso 20 jauniklių grupėje (po 10 patinėlių ir 10 patelių grupėje; po vieną patinėlį arba vieną patelę iš vados) yra paskiriami neurohistopatologiniam vertinimui nujunkymo metu (21 arba 22 PND). Jeigu gyvūnų skaičius nepakankamas, pirmenybė teikiama 2A kohortai.

3 kohorta: iš viso 20 jauniklių grupėje (po 10 patinėlių ir 10 patelių grupėje; po vieną iš vados, jei įmanoma). Iš kontrolinės grupės 56-ą (± 3) PND gali tekti paimti papildomus jauniklius, kurie būtų panaudoti kaip nuo T ląstelių priklausomų antikūnų atsako analizės (angl. TDAR) teigiamos kontrolės grupės gyvūnai.

34. Jeigu gyvūnų skaičiaus nepakanka visų kohortų tikslams, pirmenybė teikiama 1 kohortai, nes jos gyvūnus galima panaudoti F_2 gyvūnų kartai gauti. Pagal konkrečius poreikius, pvz., jeigu įtariama, kad cheminė medžiaga yra neurotoksiška, imunotoksiška arba toksiškai veikia dauginimąsi, į bet kurią iš kohortų galima paskirti papildomus jauniklius. Šiuos jauniklius galima panaudoti tyrimams skirtingais laiko momentais atlikti arba papildomoms vertinamosioms baigtims įvertinti. Į kohortas nepaskirti jaunikliai perduodami klinikiniais biocheminiams tyrimams (55 punktas) ir bendrajai nekroskopijai (68 punktas) atlikti.

P gyvūnų antrasis poravimas

35. Paprastai P gyvūnus antrą kartą poruoti nerekomenduojama, nes taip prarandama svarbi informacija apie pirmos vados implantacijos vietų skaičių (taigi prarandami poimplantacinių ir perinatalinių nuostolių duomenys, galimo teratogeninio poveikio rodikliai). Jeigu reikia patikrinti arba išsiaiškinti poveikį veikiams patelėms, tyrimą geriau pratęsti ir poruoti F_1 kartos gyvūnus. Tačiau visada galima antrą kartą poruoti P patinėlius ir pateles, su kuriomis bandymai dar neatlikti, ir taip patikslinti nevienareikšmius rezultatus arba išsamiau apibrėžti per pirmą poravimą pastebėtą poveikį vaisingumui.

GYVŲ GYVŪNŲ STEBĖJIMAI

Klinikiniai stebėjimai

36. P ir atrinktų F_1 gyvūnų bendrieji klinikiniai stebėjimai atliekami kartą per dieną. Jeigu dozės duodamos per zondą, klinikinius stebėjimus reikėtų atlikti prieš duodant dozę ir po to (stebint, ar nėra toksiškumo požymių, susijusių su didžiausia koncentracija plazmoje). Turi būti užrašomi visi su tuo susiję elgesio pokyčiai, sunkaus arba ilgesnio jauniklių atsivedimo proceso požymiai ir visi toksiškumo požymiai. Du kartus per dieną, o savaitgaliais – vieną kartą per dieną, visi gyvūnai stebimi, ar nepasireiškia didelio toksiškumo požymių, ar gyvūnai negaišta ir ar nėra nugaišę.
37. Kas savaitę turėtų būti atliekamas papildomas išsamesnis kiekvieno P ir F_1 gyvūno (po nujunkymo) tyrimas, jį patogu daryti tuo pačiu metu, kai gyvūnas sveriamas, kad gyvūnui būtų keliama kuo mažiau streso dėl jo lietim. Stebėjimai turėtų būti kruopščiai atliekami ir registruojami, tam naudojant bandymų laboratorijos nustatytas vertinimo balais sistemas. Turi būti imamasi priemonių, garantuojančių kuo mažesnę bandymo sąlygų kitimą. Stebėjimas turi apimti odos, kailio, akių, gleivinės pakitimų, išskyrų, išmatų, autonominio aktyvumo (pvz., ašarojimo, plaukų pašaušimo, vyzdžio dydžio, neįprasto kvėpavimo) registravimą, bet neturi tuo apsiriboti. Reikėtų registruoti eisenos, pozos, reakcijos į lietimą pakitimus, kloninių ar toninių judesių atsiradimą bei stereotipinį (pvz., besaikį valymąsi, pasikartojantį sukimąsi ratu) ar keistą (pvz., savęs luošinimą, vaikščiojimą atbulomis) elgesį.

Kūno masė ir pašaro bei vandens suvartojimas

38. P gyvūnai sveriami pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau mažiausiai kartą per savaitę. P patelės laktacijos laikotarpiu sveriamos tomis pačiomis dienomis kaip ir vada (žr. 44 punktą). Kiekvienas F_1 gyvūnas atskirai pasveriamas pradėjus nujunkymą (21 PND) ir vėliau sveriamas mažiausiai kartą per savaitę. Kūno masė taip pat užrašoma tą dieną, kai gyvūnai lytiškai subręsta (baigia atsiskirti apyvarpė ir aiškiai susiformuoja makštis). Visi gyvūnai pasveriami numarinimo dieną.
39. Per tyrimą pašaro ir vandens (jei bandomoji cheminė medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) suvartojimas užrašomas bent kartą per savaitę tą pačią dieną, kurią gyvūnas sveriamas (išskyrus tuos atvejus, kai gyvūnai laikomi kartu). Kiekvieno narvelio F_1 gyvūnų pašaro suvartojimas užrašomas kiekvieną savaitę nuo tada, kai gyvūnai suskirstomi į atitinkamas kohortas.

Rujos ciklai

40. Pirminės informacijos apie su bandomąja chemine medžiaga susijusį poveikį rujos ciklui gali būti turima iš anksčiau kartotinių dozių toksiškumo tyrimų ir ja galima pasinaudoti rengiant konkrečios bandomosios cheminės medžiagos išplėstinio toksiškumo vienos kartos dauginimuisi tyrimo protokolą. Paprastai rujos cikliškumo vertinimas (pagal makšties citologiją) prasideda dozių davimo laikotarpio pradžioje ir tęsiasi tol, kol pasitvirtina susiporavimas arba baigiasi 2 savaitių poravimosi laikotarpis. Jeigu prieš tyrimą buvo atliktas patelių atrankos bandymas tikrinant, ar rujos ciklai yra normalūs, tuomet pradėjus tyrimą naudinga toliau imti tepinėlius; tačiau jeigu tyrimo pradžioje kyla abejonių dėl nebūdingo poveikio (pavyzdžiui, nuo pat pradžių pastebimai sumažėja pašaro suvartojimas), prieš pradėdant likus dviem savaitėms iki poravimosi tirti tepinėlius, gyvūnams galima leisti adaptuotis prie dozių davimo, bet ne ilgiau kaip dvi savaites. Jeigu patelės tyrimo laikotarpis dėl to prasitęsia (t. y. iki 4 savaitių iki poravimosi), reikėtų apsvarstyti galimybę įsigyti jaunesnius gyvūnus ir pratęsti patinėlių tyrimo iki poravimosi laikotarpį. Makštis ar gimdos kaklelio ląstelės turi būti imamos atsargiai, kad nebūtų pažeista gleivinė ir dėl to nebūtų sukeltas pseudovaiknumas (10) (11).
41. 1A kohortos F_1 patelių makšties tepinėlius reikėtų tirti kasdien nuo makšties susiformavimo pradžios tol, kol bus pastebėtas pirmas kornifikuotas tepinėlis, tam, kad būtų galima nustatyti laiko intervalą tarp šių dviejų momentų. 1A kohortos F_1 patelių rujos ciklus taip pat reikėtų stebėti dvi savaites nuo maždaug 75 PND. Be to jeigu F_1 kartos gyvūnus reikia poruoti, 1B kohortos patelių makšties citologiją reikės stebėti nuo gyvūnų uždarymo poromis iki susiporavimo požymių atsiradimo.

Poravimas ir gestacija

42. Be standartinių rodiklių (pvz., kūno masės, pašaro suvartojimo, klinikinių stebėjimų, įskaitant tikrinimą, ar gyvūnai negaišta ir (arba) ar nenugaišo), užrašomos gyvūnų patalpinimo poromis datos, inseminacijos data ir jauniklių atsivedimo data, prekoitalinis intervalas (nuo susiporavimo iki inseminacijos), apskaičiuojama gestacijos trukmė (nuo inseminacijos iki jauniklių atsivedimo). P patelės numatomo jauniklių atsivedimo dieną reikėtų atidžiai ištirti, ar nėra distocijos požymių. Reikėtų užrašyti visas guolio sukimo arba žindymo anomalijas.
43. Jauniklių atsivedimo diena patelei yra 0 laktacijos diena (0 LD), o palikuoniui – 0 postnatalinė diena (0 PND). Dar visus palyginimus galima atlikti pagal postkoitalinį laiką, siekiant pašalinti postnatalinio vystymosi duomenų iškraipymą dėl skirtingos gestacijos laikotarpio trukmės; taip pat reikėtų užrašyti sąlyginį jauniklių atsivedimo laiką. Tai ypač svarbu, kai bandomoji cheminė medžiaga veikia gestacijos trukmę.

Palikuonių parametrai

44. Kiekviena vada tiriama kuo greičiau po atsivedimo (0 arba 1-ą laktacijos dieną) norint nustatyti jauniklių skaičių ir lytį, negyvagimius, gyvagimius, tai, ar nėra didelių anomalijų (matomų išorinių anomalijų, įskaitant gomurio nesuaukimą, ar nėra poodinių kraujosrūvų, ar odos spalva arba tekstūra yra normali, ar nėra bambagyslės, ar netrūksta pieno, ar nėra išdžiuvusio sekreto). Be to, atliekant pirmuosius klinikinius naujagimių tyrimus reikėtų kokybiškai įvertinti kūno temperatūrą, aktyvumą, reakciją į lietimą. 0 PND arba vėliau rasti negyvi jaunikliai tiriama galimais defektams ir nugaišimo priežastims nustatyti. Gyvi jaunikliai suskaičiuojami ir atskirai pasveriami 0 PND arba 1 PND, o vėliau – reguliariai, pvz., 4, 7, 14, ir 21 PND. Klinikinius tyrimus, atliekamus pagal gyvūnų amžių, reikėtų kartoti, kai palikuonys yra sveriami, arba dažniau, jeigu konkrečiais atvejais palikuonių atsivedimo metu

buvo gauta specifinių duomenų. Stebėjimai turi apimti išorines anomalijas, odos, kailio, akių, gleivinių pokyčius, sekrecijų ir ekskrecijų dažnį ir autonominių aktyvumą, bet neturi tuo apsiriboti. Taip pat turi būti registruojami eisenos pokyčiai, laikysena ir reakcija į elgesį su gyvūnu, kloniniai ar toniniai judesiai, stereotipinis ar keistas elgesys.

45. Bent vieną kartą tarp 0 PND ir 4 PND kiekvienam jaunikliui reikėtų pamatuoti anogenitalinį atstumą (angl. AGD). Jauniklio kūno masės duomenis reikėtų surinkti tą dieną, kurią matuojamas anogenitalinis atstumas; paprastai anogenitalinis atstumas turėtų atitikti jauniklio dydį, geriausia, jei jo reikšmė būtų lygi skaičiui, gautam iš kūno masės skaičiaus ištraukus kubinę šaknį (12). 12 arba 13 PND reikėtų tikrinti, ar vyriškos lyties jaunikliai turi spenelius ir (arba) areoles.
46. Visi pasirinkti F_1 gyvūnai kasdien vertinami – tikrinama, ar patinėlių varpos galva ir apyvarpė neatsiskyrė ir ar patelių makštis nesusiformavo iki numatytos šių vertinamųjų baigčių atsiradimo dienos, siekiant nustatyti, ar lytinis brendimas nėra ankstyvas. Reikėtų pažymėti visas lyties organų anomalijas, pavyzdžiui, ištisinį makšties kamštį, hipospadiją arba nesuaugusią varpą. F_1 gyvūnų lytinis subrendimas lyginamas su fiziniu išsivystymu – nustatoma, kokio amžiaus yra gyvūnas, kai atsiskiria patinėlių varpos galva ir apyvarpė, susiformuoja patelių makštis (13).

Galimo neurotoksiškumo vystymuisi vertinimas (2A ir 2B kohortos)

47. Neurotoksiškumui įvertinti iš kiekvienos dozės gaunančios grupės paimama po 10 2A kohortos patinėlių ir patelių ir po 10 2B kohortos patinėlių ir patelių (kiekvieną kohortą sudaro po 1 patinėlį arba 1 patelę iš vados; iš kiekvienos vados paimama bent po 1 jauniklį; atrenkama atsitiktine tvarka). Su 2A kohortos gyvūnais atliekami reakcijos į garsinius dirgiklius, funkcinį stebėjimų bandymų rinkinio bandymai, atliekamas motorinio aktyvumo (žr. 48–50 punktus) ir neuropatologiniai vertinimai (žr. 74–75 punktus). Reikėtų stengtis užtikrinti, kad bandymo sąlygos kuo mažiau skirtųsi ir nebūtų sistemiskai susietos su dozių davimu. Tarp kintamųjų, kurie gali paveikti elgseną yra: garso lygis (pvz., nepertraukiamas triukšmas), temperatūra, drėgmė, apšvietimas, kvapai, paros laikas, aplinkos dirgikliai. Neurotoksiškumo tyrimų rezultatus reikėtų aiškinti atsižvelgiant į atitinkamus ankstesnius kontrolinius etaloninius intervalus. 2B kohortos gyvūnus reikėtų naudoti neuropatologiniam vertinimui atlikti 21 PND arba 22 PND (žr. 74–75 punktus).
48. Bandymą su garsiniais dirgikliais reikėtų atlikti 24 PND (± 1 diena) su 2A kohortos gyvūnais. Bandomosios ir kontrolinės grupių bandymo dieną reikėtų suderinti. Kiekvieną sesiją sudaro 50 bandymų. Atliekant garsinių dirgiklių bandymą nustatomas kiekvieno bloko reakcijos, pažymėtos per 10 bandymų (5 blokai po 10 bandymų), amplitudės vidurkis, bandymo sąlygos optimizuojamos, kad būtų sudaryta galimybė priprasti prie sesijos sąlygų. Šios procedūros turėtų atitikti bandymų metodą B.53 (35).
49. Reikiamu laiku tarp 63 ir 75 PND su 2A kohortos gyvūnais atliekami funkcinį stebėjimų bandymų rinkinio bandymai ir automatizuotas motorinio aktyvumo bandymas. Šios procedūros turėtų atitikti bandymų metodus B.43 (33) ir B.53 (35). Funkcinį stebėjimų bandymų rinkinį sudaro nuodugnus subjekto išvaizdos, elgesio ir funkcinio vientisumo apibūdinimas. Šie vertinimai atliekami gyvūnus stebint narveliuose, kuriuose jie laikomi nuolat, perkėlus į standartiškai įrengtą stebėjimo (atvirą) vietą, kur gyvūnai gali laisvai judėti, ir atliekant manipuliacinius bandymus. Bandymai pradedami nuo mažiausiai interaktyvių ir baigiami interaktyviausiais. Vertinamųjų rodiklių sąrašas pateiktas 1 priedėlyje. Visus gyvūnus turėtų atidžiai stebėti parengti ir gyvūnų statuso bandyme nežinantys stebėtojai, taikydami standartizuotas procedūras, kad rezultatų skirtumai dėl skirtingų stebėtojų būtų kuo mažesni. Būtų gerai, kad, jeigu įmanoma, per vieną bandymą gyvūnus vertintų tas pats stebėtojas. Jeigu tai neįmanoma, būtina patikrinti, ar skirtingų stebėtojų rezultatai yra patikimi. Kiekvieno elgesio parametro bandymų rinkinio bandymuose turi būti naudojamos praktiniame darbe nustatytos skalės ir vertinimo balais kriterijai. Jeigu galima, stebėjimams vertinamosioms baigtims vertinti reikėtų naudoti objektyvius kiekybinius matavimus, tarp jų – subjektyvų skirstymą. Vertinant motorinį aktyvumą bandymai su kiekvienu gyvūnu atliekami atskirai. Bandymo sesija turėtų trukti pakankamai ilgai, kad būtų galima matyti, jog kontrolinės grupės gyvūnai priprato prie bandymo sesijos sąlygų. Motorinis aktyvumas turėtų būti stebimas naudojant automatinį aktyvumo fiksavimo prietaisą, kuriuo turi būti galima nustatyti ir aktyvumo padidėjimą, ir sumažėjimą (t. y. pradinę prietaisu matuojamo aktyvumo reikšmę neturėtų būti labai maža – tokia, kad nebūtų galima nustatyti jo sumažėjimo, arba labai didelė – tokia, kad nebūtų galima nustatyti aktyvumo padidėjimo). Kiekvieną prietaisą reikėtų patikrinti pagal standartines procedūras, siekiant, kiek įmanoma, užtikrinti patikimą skirtingų prietaisų veikimą visomis dienomis. Prietaisus bandomosioms grupėms reikėtų paskirstyti kuo proporcingiau. Bandymų laiką bandomosioms grupėms reikėtų paskirstyti proporcingai, kad būtų išvengta rezultatų iškraipymo dėl cirkadinio aktyvumo ritmo.
50. Jeigu iš turimos informacijos matyti, kad reikia atlikti kitus funkcinis bandymus (pvz., jutiminių, socialinių, kognityvinių funkcijų), šiuos bandymus reikėtų įtraukti nepažeidžiant kitų per tyrimą atliekamų vertinimų vientisumo. Jeigu šie bandymai atliekami su tais pačiais gyvūnais, kurie buvo naudoti atliekant standartinius bandymus

su garsiniais dirgikliais, funkcinį stebėjimų bandymų rinkinio ir motorinio aktyvumo bandymus, reikėtų suplanuoti kitokius bandymus, kad kuo labiau sumažėtų šių bandymų rezultatų iškraipymo rizika. Papildomi bandymai gali būti ypač naudingi, kai praktiniai stebėjimai, numatomas poveikis arba elgsenos mechanizmo/būdo duomenys atskleidžia specifinį neurotoksiškumo pobūdį.

Galimo imunotoksiškumo vystymuisi vertinimas (3 kohorta)

51. 56 ($\pm$ 3 dienos) PND iš kiekvienos bandomosios grupės po dešimt 3 kohortos patinėlių ir patelių (po 1 patinėlių arba 1 patelę iš vados; iš kiekvienos vados bent po 1 jauniklį; atrinktų atsitiktine tvarka) panaudojami nuo T ląstelių priklausomų antikūnų atsako analizei, t. y. pirminio IgM antikūnų atsako į nuo T ląstelių priklausomus antigenus, pavyzdžiui, avių raudonuosius kraujo kūnelius (angl. *Sheep Red Blood Cells (SRBC)*) arba moliuskų hemocianiną (angl. *Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)*), atsižvelgiant į vykdomas imunotoksiškumo bandymo procedūras, analizei (14) (15). Atsaką galima vertinti skaičiuojant specialias ląstelių plokšteles (angl. PFC) blužnyje arba nustatant SRBC arba KLH būdingus IgM antikūnus serume ELISA metodu tuo metu, kai atsakas yra stipriausias. Atsakas dažniausiai būna stipriausias ketvirtą (atsakas pagal PFC metodą) arba penktą (ELISA) dieną po intraveninės imunizacijos. Kai pirminis antikūnų atsakas yra tiriamas skaičiuojant ląstelių plokšteles, gyvūnų pogrupius leidžiama vertinti skirtingomis dienomis, jeigu: gyvūnų pogrupiai imunizuojami ir gyvūnai numarinami taip, kad ląstelių plokštelės būtų skaičiuojamos tada, kai atsakas yra stipriausias; pogrupiuose turi būti po vienodą vyriškos ir moteriškos lyties palikuonių skaičių iš visų dozės grupių, įskaitant kontrolinę grupę; vertinami maždaug tokio paties postnatalinio amžiaus pogrupių gyvūnai. Sąlytis su bandomąja chemine medžiaga tęsis tol, kol liks viena diena iki blužnies paėmimo PFC tyrimui arba serumo paėmimo ELISA tyrimui.

Tolesnis galimo toksiškumo dauginimuisi vertinimas (1B kohorta)

52. 1B kohortos gyvūnus galima laikyti tyrimui ilgiau negu 90 PND ir, jei reikia, juos sukergti, kad būtų gauta F₂ karta. Tos pačios dozės grupės patinėliai ir patelės uždaromi kartu (stengiantis nesuporuoti tų pačių tėvų palikuonių) ir laikomi dvi savaites nuo 90 PND arba vėlesnės dienos, bet ne vėliau kaip nuo 120 PND. Procedūra tokia pati, kokia taikyta P gyvūnams. Tačiau, atsižvelgiant į įrodomosios vertės analizę, vadas gali pakakti numarinti 4 PND, užuot jas laikius iki nujunkymo ir ilgiau.

GALUTINIAI STEBĖJIMAI

Klinikinė biochemija/hematologija

53. Stebima, ar P gyvūnams nepasireiškia sisteminis poveikis. Nutraukus bandymą, iš nustatytos vietos paimami atsitiktine tvarka atrinktų – po dešimt iš vienos dozės grupės – numarintų nešertų P kartos vienos dozės grupės patinėlių ir patelių kraujo mėginiai; šie mėginiai saugomi reikiamomis sąlygomis, atliekami daliniai arba išsamūs jų hematologiniai, klinikiniai biocheminiai, T4 ir TSH tyrimai, kiti tyrimai pagal žinomą bandomosios cheminės medžiagos poveikio pobūdį (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)). Turėtų būti tiriami šie hematologiniai parametrai: hematokrito vertė, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, bendras leukocitų skaičius ir leukocitų formulė, trombocitų skaičius ir kraujo krešėjimo laikas/geba. Plazmoje arba serume tiriami: gliukozė, bendras cholesterolis, šlapalas, kreatininas, bendras baltymas ir albuminas, mažiausiai du fermentai, rodantys poveikį kepenų ląstelėms (tokie kaip alaninaminotransferazė, aspartataminotransferazė, šarminė fosfatazė, gama-glutamiltripeptidazė ir sorbitoldehidrogenazė). Tam tikromis aplinkybėmis papildomi fermentų ir tulžies rūgščių tyrimai gali suteikti naudingos informacijos. Be to, iš visų gyvūnų paimtą kraują galima saugoti, jei prireiktų jo analizės vėliau, norint išsiaiškinti neaiškių poveikį arba gauti duomenų apie sąlytį su medžiaga organizmo viduje. Jeigu P gyvūnų antros kartos poruoti neketinama, kraujo mėginiai paimami prieš pat numarinimą arba numaravimo metu. Jeigu gyvūnai paliekami, kraujo mėginius reikėtų paimti prieš kelias dienas iki poravimo antrą kartą. Jeigu iš turimų kartotinių dozių bandymų duomenų matyti, kad bandomoji cheminė medžiaga to parametro neveikia, prieš bandymą nutraukiant reikėtų atlikti šlapimo tyrimus, per kuriuos įvertinami šie parametrai: išvaizda, tūris, osmolališkumas ar santykinis tankis, pH, baltymai, gliukozė, kraujas ar kraujo ląstelės, ląstelių liekanos. Šlapimo mėginius taip pat galima surinkti tam, kad būtų galima stebėti, ar į jį pateko bandomoji cheminė medžiaga ir (arba) jos metabolitas (-ai).
54. Taip pat stebima, ar F₁ gyvūnams nepasireiškia sisteminis poveikis. Nutraukus bandymą, iš atsitiktine tvarka atrinktų – po dešimt iš vienos dozės grupės – nešertų 1A kohortos patinėlių ir patelių paimami kraujo mėginiai; šie mėginiai saugomi reikiamomis sąlygomis, atliekami standartiniai klinikiniai biocheminiai tyrimai, taip pat vertinamas skydliaukės hormonų lygis serume (T4 ir TSH), atliekamas hematologinis tyrimas (bendras leukocitų skaičius, leukocitų formulė, eritrocitų skaičius), tiriamas šlapimas.

55. 4 PND atliekama neberekalingų jauniklių bendroji nekroskopija, matuojama skydliaukės hormono (T4) koncentracija serume. Jei reikia, vienos vados gimusių jauniklių (4 PND) kraują galima tirti kartu, atliekant biocheminius/skydliaukės hormonų tyrimus. Taip pat paimama nujunkytų gyvūnų, kuriems 22 PND atliekama bendroji nekroskopija (į pogrupius neatrinktų F_1 gyvūnų), kraujo T4 ir TSH analizei atlikti.

Spermos parametrai

56. Matuojami visų P kartos patinėlių spermos parametrai, išskyrus tuos atvejus, kai turima duomenų, kad per 90 dienų tyrimą spermos parametrai nebuvo paveikti. Reikėtų patikrinti visų A1 kohortos patinėlių spermos parametrus.
57. Nutraukus bandymą, užrašoma visų P ir F_1 patinėlių (1A kohorta) sėklidžių ir antisėklidžių masė. Bent viena sėklidė ir vienas antisėklidis paliekamas histopatologiniam tyrimui. Likęs antisėklidis panaudojamas antisėklidžio uodegoje esantiems spermos rezervams suskaičiuoti (16) (17). Spermatozoidai iš antisėklidžio uodegos (arba sėklinio latako) surenkami taikant metodus, kuriais kuo mažiau būtų trukdoma įvertinti spermos judrumą ir morfologiją (18).
58. Spermatozoidų judrumą galima vertinti iš karto po numarinimo arba analizę galima atlikti vėliau. Vis judresnių spermatozoidų procentinę dalį galima nustatyti subjektyviai arba objektyviai pasitelkiant kompiuterinę judrumo analizę (19) (20) (21) (22) (23) (24). Vertinant spermos morfologiją, spermos mėginiai iš antisėklidžio uodegos (arba sėklinio latako) ištiriami kaip fiksuoti preparatai bei skystoje terpėje (25) ir bent po 200 vieno mėginio spermatozoidų suskirstomi į normalius (normali ir galvutė, ir jungiančioji dalis/uodegėlė) ir nenormalius. Morfologinės spermatozoidų anomalijos būtų spermatozoidų sulipimas, izoliuotos galvutės ir deformuotos galvutės ir (arba) uodegėlės (26). Deformuotos arba didelės spermatozoidų galvutės gali būti spermos išskyrimo defektų požymis.
59. Jeigu per nekroskopiją spermos mėginiai užšaldomi, tepinėliai fiksuojami ir spermos judrumo vaizdo analizė užrašoma (27), vėlesnę analizę galima atlikti tik su kontrolinės grupės arba didelės dozės gavusiais patinėliais. Tačiau jeigu pastebimas su dozės davimu susijęs poveikis, reikėtų įvertinti ir mažesnių dozių grupes.

Bendroji nekroskopija

60. Nutraukus bandymą arba darant bandymą anksčiau nugaišusiems P ir F_1 gyvūnams atliekama nekroskopija ir makrosopiškai patikrinamos visos struktūrinės anomalijos arba patologiniai pakitimai. Ypatingas dėmesys skiriamas dauginimosi sistemos organams. Humaniškai numarinti gaištantys jaunikliai ir nugaišę jaunikliai, jei nemaceruoti, tiriami galimiems defektams ir nugaišimo priežastiai nustatyti, vėliau užkonservuojami.
61. Suaugusioms P ir F_1 patelėms yra tiriamas makšties tepinėlis nekroskopijos dieną siekiant nustatyti rudos ciklo etapą ir sulyginti su dauginimosi organų histopatologiniais duomenimis. Visų P (ir, jei reikia, F_1) patelių gimda yra tiriami implantavimo vietų buvimui ir skaičiui nustatyti, stengiantis nepakenkti histopatologiniam įvertinimui.

Organų masė ir audinių konservavimas. P ir F_1 gyvūnai

62. Nutraukus bandymą, visų P ir F_1 suaugusių gyvūnų iš atitinkamų kohortų (kaip nurodyta toliau) kūno masę ir toliau išvardytų dar drėgnų organų masę po skrodimo reikia užrašyti kuo skubiau, kad nespėtų išdžiūti. Organai užkonservuojami reikiamomis sąlygomis. Jeigu nenurodyta kitaip, poriniai organai sveriami atskirai arba kartu, nuosekliai laikantis tyrimą atliekančios laboratorijos įprastai taikomos praktikos.

— Gimda (su kiaušintakiais ir kakleliu), kiaušidės.

— Sėklidės, antisėklidžiai (visas organas ir uodega, iš kur imti mėginiai spermatozoidams skaičiuoti).

— Prostata (ir dorsolateralinė, ir ventralinė skiltys kartu). Prostatos kompleksą išpjauti reikėtų labai atsargiai, stengiantis nepradurti skysčio pilnų pūslelių. Jeigu dozių davimas paveikė bendrą prostatos masę, dorsolateralinę ir ventralinę segmentus po fiksavimo reikėtų atsargiai atskirti ir atskirai pasverti.

- Sėklinės pūslelės su koaguliacijos liaukomis ir jų skysčiais (kaip vienas vienetas).
 - Smegenys, kepenys, inkstai, širdis, blužnis, užkrūčio liauka, hipofizė, skydliaukė (po fiksavimo), antinksčių liaukos ir žinomi veikiami organai arba audiniai.
63. Be pirmiau išvardytų organų, atitinkamomis sąlygomis konservuojami periferinių nervų, raumenų, nugaros smegenų, akių ir regos nervo, skrandžio ir žarnyno sistemos, šlapimo pūslės, plaučių, trachėjos (su skydliauke ir prieškydine liauka), kaulų čiulpų, sėklinio latako (patinėlių), pieno liaukų (patinėlių ir patelių) ir makšties mėginiai.
64. Visi 1A kohortos gyvūnų organai pasveriami ir užkonservuojami histopatologiniam įvertinimui atlikti.
65. Prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiu sukeltam imunotoksiniam poveikiui tirti iš kiekvienos dozės gaunančios grupės paimama po dešimt 1A kohortos patinėlių ir patelių (po 1 patinėlį arba patelę iš vados, iš kiekvienos vados paimama bent po 1 jauniklį, atrinktą atsitiktine tvarka) ir nutraukus bandymą tiriami šie dalykai:
- sveriami limfmazgiai, esantys arti sąlyčio su chemine medžiaga vietos, ir nutolę (papildomai, nes visų 1A kohortos gyvūnų antinksčių liaukos, užkrūčio liauka, blužnis jau būna pasverti);
 - blužnies limfocitų subpopuliacijos analizė (CD4+ ir CD8+ T limfocitai, B limfocitai, ląstelės – natūraliosios žudikės) panaudojant vieną blužnies dalį, kita blužnies dalis konservuojama histopatologiniam įvertinimui.
- Neimunizuotų (1A kohortos) gyvūnų blužnies limfocitų subpopuliacijų analizė parodys, ar sąlytis yra susijęs su „padėjėjų“ (CD4+) arba citotoksinių (CD8+) užkrūčio liaukos išskirtų limfocitų arba ląstelių – natūraliųjų žudikių pasiskirstymo pokyčiais (sparčia reakcija į neoplastines ląsteles ir patogenus) esant imunologiškai stabiliai būsenai.
66. Iš 1B kohortos gyvūnų sveriami šie organai ir paruošiami šių atitinkamų audinių blokai:
- makštis (nesverta);
 - gimda su kakleliu;
 - kiaušidės
 - sėklidės (bent viena);
 - antiseklidžiai;
 - sėklinės pūslelės ir koaguliacijos liaukos;
 - prostata;
 - hipofizė;
 - nustatyti tiksliniai organai.

1B kohortos gyvūnų histopatologinį įvertinimą reikėtų atlikti, jeigu 1A kohortos gyvūnų tyrimo rezultatai yra nevienareikšmiai, arba tais atvejais, kai kyla įtarimų, kad medžiaga gali būti toksiška dauginimosi arba endokrinei sistemoms.

67. 2A ir 2B kohortos: neurotoksiškumo vystymuisi bandymai (21 arba 22 PND ir suaugusių palikuonių). 2A kohortos gyvūnai numarinami po elgsenos bandymo, galvos smegenų masė užrašoma, atliekama išsami neurohistopatologija neurotoksiškumui įvertinti. 2B kohortos gyvūnai numarinami 21 arba 22 PND, galvos smegenų masė užrašoma, atliekamas išsamus mikroskopinis galvos smegenų tyrimas neurotoksiškumui įvertinti. Perfuzinė fiksacija yra reikalaujama 2A kohortos gyvūnams, bet neprivaloma 2B kohortos gyvūnams, kaip numatyta pagal B.53 metodą (35).

Organų masė ir audinių konservavimas. F₁ nujunkyti gyvūnai

68. Į kohortas neatrinkti jaunikliai, taip pat silpniausi jaunikliai po nujunkymo, 22 PND, yra numarinami, nebent iš gautų rezultatų paaiškėja, kad reikia toliau tirti gyvus gyvūnus. Atliekama numarintų jauniklių bendroji nekroskopija, taip pat įvertinami jų dauginimosi organai, kaip aptarta 62 ir 63 punktuose. Iki 10 kiekvienos lyties iš kiekvienos grupės gyvūnų, priklausančių kuo įvairesnėms vadoms, galvos smegenys, blužnis ir užkrūčio liaukos turėtų būti pasveriamos ir laikomos reikiamomis sąlygomis. Be to, šių patinėlių ir patelių jauniklių pieno liaukų audinius reikėtų užkonservuoti tolesnei mikroskopinei analizei ⁽¹⁾ (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)). Didelės anomalijos ir paveikti audiniai saugomi tam atvejui, jei prireiktų atlikti jų histopatologinį tyrimą.

⁽¹⁾ Tyrimai parodė, kad krūtų liaukos, ypač krūtų vystymasis ankstyvuojų gyvenimo laikotarpiu, yra jautri estrogeninio poveikio vertinamoji baigtis. Tvirtinant tinkamumą į bandymų metodą rekomenduota įtraukti abiejų lyčių jauniklių pieno liaukų vertinamąsias baigtis.

Histopatologija. P gyvūnai

69. Daromi išsamūs histopatologiniai visų P gyvūnų, priklausančių kontrolinėms ir didelės dozės grupėms, organų, išvardytų 62 ir 63 punktuose, tyrimai. Dar tiriami mažesnių dozių grupių gyvūnų organai, kuriems pasireiškia su dozių davimu siejami pakitimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. Be to, daromas histopatologinis visų gyvūnų, kuriems įtariamas sumažėjęs vaisingumas, pvz., kurie negalėjo susiporuoti, pastoti, būti reproduktoriumi arba atsivesti sveikų palikuonių arba kurių rujos ciklas arba spermatozoidų skaičius, judrumas arba morfologija buvo paveikti, dauginimosi organų įvertinimas.

Histopatologija. F₁ gyvūnai*1 kohortos gyvūnai*

70. Daromi išsamūs histopatologiniai visų 1A kohortos gyvūnų, priklausančių kontrolinėms ir didelės dozės grupėms, organų, išvardytų 62 ir 63 punktuose, tyrimai. Iš kiekvienos vados reikėtų paimti bent po vieną kiekvienos lyties jauniklį. Dar turėtų būti tiriami mažesnių dozių grupių gyvūnų organai ir audiniai, kuriems pasireiškia su dozių davimu siejami pakitimai, ir visi dideli pažeidimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. Vertinant prenataliniu ir postnataliniu laikotarpiams organams sukeltą poveikį, reikėtų atlikti 1A kohortos F₁ patinėlių ir 10 patelių limfmazgių ir kaulų čiulpų histopatologinį įvertinimą, šalia visiems 1A kohortos gyvūnams jau atlikto histopatologinio užkrūčio liaukos, blužnies, antinksčių liaukų įvertinimo.
71. Jeigu įtariama, kad medžiaga gali būti toksiška dauginimosi arba endokrininei sistemai, atliekamas visų 1B kohortos gyvūnų dauginimosi ir endokrininių audinių, paruoštų 66 punkte nurodytais blokais, histopatologinis tyrimas. 1B kohortos gyvūnų histopatologinis tyrimas atliekamas ir tada, kai 1A kohortos tyrimo rezultatai yra nevienareikšmiai.
72. Suaugusių patelių kiaušidėse turėtų būti pirmapradžių ir augančių folikulų, geltonkūnių; todėl atliekant histopatologinį tyrimą reikėtų stengtis F₁ patelių pirmapradžius ir mažus augančius folikulus bei geltonkūnius įvertinti kiekybiškai; gyvūnų skaičius, kiaušidžių pjūvio pasirinkimas ir pjūvio mėginių dydis turėtų statistiškai atitikti taikomą įvertinimo metodiką. Folikulus galima skaičiuoti pirmiausia imant kontrolinės ir didelės dozės grupių gyvūnus, ir jeigu juos tiriant pastebimas neigiamas poveikis, tada ištirti mažesnes dozes gavusius gyvūnus. Tyrimą sudaro pirminių folikulų skaičiavimas, taip pat galima skaičiuoti ir mažus augančius folikulus, kad būtų galima palyginti paveiktas ir kontrolines kiaušides (žr. EBPO Rekomendacinį dokumentą Nr. 151 (40)). Geltonkūnio vertinimą reikėtų atlikti lygiagrečiai rujos cikliškumo bandymui, kad vertinant būtų galima atsižvelgti į rujos ciklo etapą. Kiaušintakis, gimda ir makštis tiriami tikrinant atitinkamus organams būdingus vystymosi požymius.
73. Išsamus sėklidžių histopatologinis tyrimas atliekamas visiems F₁ patinėliams siekiant nustatyti su dozių davimu susijusį poveikį sėklidžių pokyčiams ir vystymuisi bei spermatogenezei (38). Jeigu įmanoma, reikėtų ištirti sėklidės kanalėlių pjūvius. Antsėklidžių galvutė, kūnas ir uodega bei sėkliniai latakai tiriami tikrinant atitinkamus organams būdingus vystymosi požymius ir reikalingus P patinėlių parametrus.

2 kohortos gyvūnai

74. Neurohistopatologinis tyrimas atliekamas visiems didelės dozės grupės ir kontrolinės grupės 2A kohortos gyvūnams pagal lytį, užbaigus neurobihevioristinį bandymą (po 75 PND, bet ne vėliau kaip 90 PND). Smegenų histopatologinis tyrimas atliekamas visiems didelės dozės ir kontrolinės grupės 2B kohortos gyvūnams pagal lytį 21 arba 22 PND. Dar tiriami mažesnės ir vidutinės dozės grupių gyvūnų organai ir audiniai, kuriems pasireiškia su bandomąja medžiaga siejami pakitimai, kad būtų lengviau nustatyti NOAEL. 2A ir 2B kohortų gyvūnų smegenys tiriami įvairiais pjūviais, kad būtų galima ištirti uoslės svogūnėlius, smegenų žievę, hipokampą, bazalinius ganglijus, gumburą, pogumburį, vidurines smegenis (keturkalnį, smegenų dangtį ir smegenų kojytes), smegenų kamieną ir smegenėles. Tik 2A kohortos gyvūnams atliekami akių (tinklainės ir regos nervo), periferinio nervo, raumenų ir stuburo smegenų mėginių tyrimai. Visos neurohistologinės procedūros turėtų atitikti bandymų metodą B.53 (35).
75. Morfometrinius (kiekybinius) vertinimus reikėtų atlikti imant reprezentatyvias smegenų sritis (kruopščiai pagal mikroskopinius parametrus pasirinktus homologinius pjūvius), į juos galima įtraukti tiesinius ir (arba) zoninius konkrečių smegenų sričių matavimus. Kiekvienam parametrom (lygiui) ištirti reikėtų imi bent tris pjūvius iš eilės, kad būtų galima pasirinkti vienalytiškiausią ir reprezentatyviausią konkrečios vertintinos smegenų srities pjūvį. Neuropatologas turėtų atitinkamai įvertinti, ar matavimams parengti pjūviai yra vienalytiški, palyginti su kitais to

paties mėginio pjūviais, ir ar juos galima įtraukti į tyrimą, nes visų pirma tiesiniai matavimai gali pakisti už palyginti trumpo atstumo (28). Nevienalytiškų pjūvių nereikėtų naudoti. Nors tikslas yra į imtį įtraukti visus tam tikslui paskirtus gyvūnus (po 10 kiekvienos lyties ir dozės lygmens), tinka ir mažesnis gyvūnų skaičius. Tačiau imtis, sudaryta iš mažiau negu 6 kiekvienos lyties ir dozės lygmens gyvūnų, pagal šį bandymų metodą dažniausiai bus laikoma nepakankama. Stereologiją galima naudoti, kai norima nustatyti su dozės davimu susijusį poveikį tokiems parametrams kaip konkrečių neuroanatominių sričių dydis ar ląstelių skaičius. Visi audinių mėginių paruošimo aspektai nuo audinių fiksacijos iki audinių mėginių išpjovimo, audinių paruošimo ir objektinių stiklėlių dažymo turėtų būti tarpusavyje taip suderinti, kad kiekvienoje partijoje būtų reprezentatyvių mėginių iš kiekvienos dozės grupės. Jei reikia atlikti morfometrinę arba stereologinę analizę, visais dozės lygmenimis paimti galvos smegenų audiniai turėtų būti įlieti į tinkamą terpę tuo pačiu metu, siekiant išvengti susitraukimo artefaktų, kurie gali būti susiję su pernelyg ilgu laikymu fiksytyve.

ATASKAITA

Duomenys

76. Duomenys turėtų būti pateikiami atskirai ir apibendrinami lentelėse. Jei reikia, apie kiekvieną bandymo grupę ir apie kiekvieną kartą turėtų būti pateikiami šie duomenys: gyvūnų skaičius bandymo pradžioje, per bandymą rastų nugaišusių arba dėl humaniškų priežasčių numarintų gyvūnų skaičius, nugaišimo dėl bet kurios priežasties ir humaniško numarinimo laikas, vaisingų gyvūnų skaičius, vaikingų patelių skaičius, vadą atsivedusių patelių skaičius, gyvūnų, kuriems pasireiškė toksikumo požymiai, skaičius. Ataskaitoje taip pat reikėtų pateikti toksikumo apibūdinimą, įskaitant pasireiškimo pradžią, trukmę ir sunkumą. Požymiai turi būti registruojami žymint jų pradžią, tipą, sunkumo laipsnį ir trukmę.
77. Skaičiais išreikšti rezultatai turėtų būti apdoroti tinkamu ir priimtiniu statistiniu metodu. Statistinius metodus reikėtų pasirinkti rengiant bandymo modelį, pagal juos turėtų būti tinkamai tvarkomi nenormalieji duomenys (pvz., skaičiavimo duomenys), cenzūruotieji duomenys (pvz., riboto stebėjimo laiko), ne nepriklausomi duomenys (pvz., poveikis vada ir kartojami matavimai), nevienoda sklaida. Apibendrintieji tiesiniai mišrūs modeliai ir dozės bei atsako tarpusavio ryšio modeliai apima plačią analitinių priemonių, kurias gali būti tikslinga taikyti pagal šį bandymų metodą surinktiems duomenims, klasę. Ataskaitoje turėtų būti pakankamas kiekis informacijos apie analizės metodą ir taikytą kompiuterio programą, kad nepriklausomas ekspertas ar statistikos specialistas galėtų įvertinti/iš naujo įvertinti analizės eigą.

Rezultatų įvertinimas

78. Šio toksikumo bandymo duomenys įvertinami atsižvelgiant į pastebėtą poveikį, įskaitant nekroskopiją ir mikroskopinio tyrimo rezultatus. Vertinant, be kitų dalykų, vertinamas ryšys tarp dozės ir anomalijų, įskaitant didelius pažeidimus, atsiradimo, dažnumo ir sunkumo arba to ryšio nebuvimas. Veikiami organai, vaisingumas, klinikinės anomalijos, dauginimosi ir vados rodikliai, kūno masės pokyčiai, gaištamumas ir kitoks toksiškas poveikis ir poveikis vystymuisi taip pat turėtų būti vertinami. Ypač daug dėmesio reikėtų skirti konkrečiai lyčiai pasireiškusiems pokyčiams. Įvertinant rezultatus reikia atsižvelgti į bandomosios cheminės medžiagos fizikines ir chemines savybes ir toksikokinetinius duomenis, įskaitant perdavimą per placenta ir išskyrimą į pieną, jei tokių duomenų turima.

Bandymo ataskaita

79. Bandymo ataskaitą turėtų sudaryti ši per bandymą su P₁ ir F₂ gyvūnais gauta informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- visa svarbi turima informacija apie cheminę medžiagą, toksikokinetines ir toksikodinamines bandomosios cheminės medžiagos savybes;
- tapatumo duomenys;
- grynumas.

Nešiklis (jei naudojamas):

- nešiklio pasirinkimo pagrindimas, jei nešiklis ne vanduo.

Bandomieji gyvūnai:

- naudota rūšis/veislė;
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis;
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras, kraiko medžiagos ir t. t.;
- kiekvieno gyvūno kūno masė bandymo pradžioje;
- P patelių makšties tepinėlių duomenys prieš dozių davimo pradžią (jeigu tuo metu duomenys renkami);
- P kartos gyvūnų poravimo duomenys, nurodant patinėlius ir pateles, su kuriomis jie poruoti, poravimo sėkmė;
- duomenys apie vadas, kurioms priklauso F_1 kartos gyvūnai.

Bandymo sąlygos:

- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;
- išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos preparato ruošimą arba jos dėjimą į pašarą, gautos koncentracijos vertės;
- preparato stabilumas ir vienalytiškumas nešiklyje arba priede (pvz., pašaruose, geriamajame vandenyje), kraujyje ir (arba) piene naudojimo ir laikymo tarp dozių davimo sąlygomis;
- išsami informacija apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašare ar geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą), jei tinka;
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę (įskaitant pašaro sudėtį, jei turima duomenų);
- išsamus atsitiktinės atrankos, taikomos jaunikliams brokuoti ir suskirstyti į bandymo grupes, aprašas;
- aplinkos sąlygos;
- tyrimo grupės narių sąrašas, įskaitant profesinį parengimą.

Rezultatai (suvestiniai duomenys ir duomenys apie kiekvieną gyvūną pagal lytį ir dozę):

- pašaro suvartojimas ir, jei matuojamas, vandens suvartojimas, pašaro efektyvumas (kūno masės padidėjimas vienam suvartoto pašaro gramui, išskyrus tą laiką, kai gyvūnai laikomi kartu, ir išskyrus laktacijos laikotarpį), P ir F_1 gyvūnams nurodomas suvartotos bandomosios cheminės medžiagos kiekis (kai duodama su pašaru/geriamuoju vandeniu);
- absorbcijos duomenys (jei yra);
- P gyvūnų kūno masė;
- atrinktų F_1 gyvūnų kūno masės po atjunkymo duomenys;
- nugaišimo darant bandymą laikas arba informacija, kad gyvūnai išgyveno iki bandymo nutraukimo;
- klinikinių požymių tipas, sunkumas ir trukmė (grįžtami ar negrįžtami),
- kraujo, šlapimo ir klinikinių cheminių tyrimų duomenys, įskaitant TSH ir T4;
- blužnies ląstelių (T, B, natūraliųjų žudikių) fenotipinė analizė;
- kaulų čiulpų akytumas;
- duomenys apie atsaką į toksiškumą;
- P ir F_1 patelių, kurių rufos ciklas yra normalus arba nenormalus, skaičius ir ciklo trukmė;
- laikas iki susiporavimo (prekoitalinis intervalas, dienų skaičius nuo uždarymo poromis iki susiporavimo);
- toksinis ir kitoks poveikis dauginimuisi, taip pat gyvūnų, kurie sėkmingai susiporavo, buvo vaikingi, atsivedė ir žindė palikuonis, pateles apvaisinusių patinėlių, patelių, kurioms pasireiškė distocija/kurių jauniklių atsivedimo procesas truko ilgiau arba buvo sunkus, skaičius ir procentinė dalis;
- gestacijos ir, jei turima duomenų, jauniklių atsivedimo proceso trukmė;
- implantacijų skaičius, vados dydis ir vyriškos lyties jauniklių procentinė dalis;

- poimplantacinių nuostolių atvejų, gyvagimių ir negyvagimių skaičius ir procentinė dalis;
- vados masės ir jauniklių masės duomenys (patinėlių ir patelių duomenys pateikiami kartu), silpniausių jauniklių, jei jų nustatoma, skaičius;
- jauniklių su akivaizdžiai matomomis anomalijomis skaičius;
- toksinis arba kito tipo poveikis palikuonims, postnataliniam augimui, gyvybingumui ir t. t.;
- duomenys apie fizinius jauniklių parametrus ir kiti postnatalinio vystymosi duomenys;
- duomenys apie F₁ gyvūnų lytinę subrendimą;
- jauniklių ir suaugusių gyvūnų funkcinį stebėjimą duomenys, kai tinka,
- P ir suaugusių F₁ gyvūnų kūno masė numarinant ir absoliučios bei santykinės organų masės duomenys;
- nekroskopijos duomenys;
- išsamus visų histopatologinių rezultatų aprašymas;
- P ir F₁ patinėliams – suminis spermatozoidų antsklidžio uodegoje skaičius, vis judresnių spermatozoidų procentinė dalis, morfologiškai normalių spermatozoidų procentinė dalis ir spermatozoidų su kiekviena identifikuota anomalija procentinė dalis;
- P ir F₁ patelių kiaušidėse esančių folikulų skaičius ir subrendimo etapas, jei reikia;
- geltonkūnių F₁ patelių kiaušidėse skaičius;
- statistinis rezultatų apdorojimas, jei daromas.

2 kohortos parametrai:

- išsamus stebėjimų ir metodikos standartizavimo procedūrų aprašas ir taikytos apibrėžtys stebėjimų rezultatams įvertinti balais;
- taikytų bandymo procedūrų sąrašas ir jų taikymo pagrindimas;
- duomenys apie taikytas elgsenos/funkcinių, neuropatologinių ir morfometrinių bandymų procedūras, taip pat informacija ir išsamūs duomenys apie automatizuotus prietaisus;
- prietaisų kalibravimo procedūros ir procedūros, skirtos užtikrinti, kad prietaisų parodymai būtų lygiaverčiai ir kad bandymo procedūros būtų proporcingai taikomos dozės gaunančioms grupėms;
- glaustas pagrindimas paaiškinant sprendimus, kuriuos priimant remtasi profesionaliu vertinimu;
- išsamus nustatytų elgsenos, funkcinių, neuropatologinių ir neurocheminių požymių aprašas pagal lytį ir dozės grupę, įskaitant padidėjimą ir sumažėjimą dėl kontrolės;
- smegenų masė;
- visos diagnozės pagal neurologinius požymius ir pažeidimus, įskaitant natūraliai atsirandančias ligas arba būsenas;
- požymių pavyzdžių nuotraukos;
- mažo padidėjimo mikroskopinės nuotraukos morfometrijai naudotų pjūvių homologijai įvertinti;
- statistinis rezultatų apdorojimas, įskaitant duomenims ir rezultatams, nepaisant to, ar jie buvo reikšmingi, ar ne, analizuoti taikytus statistinius modelius;
- tai, kiek visas kitas toksinis poveikis turėjo įtakos išvada dėl bandomosios cheminės medžiagos galimo neurotoksiškumo, pagal lytį ir dozės grupę;
- tai, kiek toksikokinetiniai duomenys turėjo įtakos išvada;
- duomenys, kuriais pagrindžiamas bandymų metodo patikimumas ir jautrumas (t. y. teigiami ir ankstesni kontroliniai duomenys);
- neuropatologinio ir funkcinio poveikio ryšys, jei yra;
- NOAEL arba etaloninė dozė motininėms patelėms ir jaunikliams pagal lytį ir grupę;
- bendras duomenų aiškinimas remiantis gautais rezultatais, įskaitant išvadą, ar cheminė medžiaga sukėlė neurotoksišką poveikį vystymuisi, ir NOAEL.

3 kohortos parametrai:

- IgM antikūnų serume titrai (jautrinimas SRBC ir KLH), blužnies IgM PFC vienetai (jautrinimas SRBC);
- laboratorija, kuri pirmą kartą rengiasi atlikti analizę, per optimizavimo procedūrą (visos laboratorijos periodiškai (pvz., kasmet)) turėtų patvirtinti TDAR metodo rezultatyvumą;
- bendras duomenų aiškinimas remiantis gautais rezultatais, įskaitant išvadą, ar cheminė medžiaga sukėlė imunotoksinį poveikį vystymuisi, ir NOAEL.

Rezultatų aptarimas.

Išvados, įskaitant tėviniams gyvūnams ir palikuonims gautas NOAEL vertes.

Reikėtų pateikti visą informaciją, kuri buvo gauta ne per bandymą, bet yra naudinga aiškinant rezultatus (pvz., poveikio panašumas į kurios nors žinomos neurotoksiškos medžiagos poveikį).

Rezultatų aiškinimas

80. Išplėstinis toksiškumo vienos kartos dauginimuisi bandymas suteiks informacijos apie kartotinio cheminės medžiagos naudojimo poveikį visais reikiamais dauginimosi ciklo tarpsniais. Pirmiausia bandymas suteikia informacijos apie dauginimosi sistemą ir palikuonių iki 90 PND amžiaus vystymosi, augimo, išgyvenimo ir funkcines vertinamąsias baigtis.
81. Aiškinant bandymo rezultatus reikėtų atsižvelgti į visą turimą informaciją apie cheminę medžiagą, įskaitant fizines ir chemines savybes, TK ir toksikodinamines savybes, turimą svarbią informaciją apie struktūriškai analogiškas medžiagas, anksčiau atliktų toksiškumo tyrimų su bandomąja chemine medžiaga rezultatus (pvz., ūmaus toksiškumo, toksiškumo po pakartotinio suvartojimo, mechanistinių tyrimų ir tyrimų, per kuriuos vertinta, ar vertinant *in vitro/in vivo* metaboliškas savybes tarp gyvūnų rūšių yra reikšmingų kokybinių ir kiekybinių skirtumų). Bendrosios nekroskopijos ir organų masės rezultatai įvertinami atsižvelgiant į stebėjimus kitų kartotinės dozės bandymų metu, jei įmanoma. Vertinant palikuonių augimo sumažėjimą galima vertinti, ar bandomosios cheminės medžiagos poveikis pieno sudėčiai turėjo tam įtakos (29).

2 kohorta (Neurotoksiškumas vystymuisi)

82. Neurobiheviistorinius ir neuropatologinius rezultatus reikėtų aiškinti atsižvelgiant į visus duomenis, laikantis duomenų įrodomosios vertės principo ir remiantis ekspertų vertinimu. Reikėtų aptarti elgsenos arba morfologinių duomenų, jei tokių gauta, pavyzdžius, taip pat duomenis apie atsaką į dozes. Į šį apibūdinimą reikėtų įtraukti neurotoksiškumo vystymuisi, įskaitant žmonių epidemiologinius tyrimus arba bylų ataskaitas, bandymų su bandomaisiais gyvūnais duomenis (pvz., toksikokinetinius duomenis, informaciją apie struktūrą ir aktyvumą, kitų toksiškumo tyrimų duomenis). Vertinant duomenis reikėtų aptarti ir biologinį, ir statistinį reikšmingumą. Be kitų dalykų, taip pat reikėtų įvertinti neuropatologinių ir elgsenos pakitimų tarpusavio ryšį, jei jis pastebėtas. Informacijos, kuri padėtų aiškinti neurotoksiškumo vystymuisi rezultatus, galima rasti Bandymų metode B.53 (35) ir Tyl et al., 2008 (31).

3 kohorta (Imunotoksiškumas vystymuisi)

83. Imuninės funkcijos slopinimą arba aktyvinimą, nustatomą pagal TDAR (nuo T ląstelių priklausomų antikūnų atsaką), reikėtų įvertinti atsižvelgiant į visų atliktų stebėjimų rezultatus. TDAR rezultatų reikšmingumą gali patvirtinti kiti imunologiniai požymiai susiję rodikliai (pvz., kaulų čiulpų akytumas, limfoidinių audinių masė ir histopatologija, limfocitų subpopuliacijos pasiskirstymas). TDAR nustatytas poveikis gali būti ne toks reikšmingas, jeigu kiti toksiškumo aspektai stebėti esant mažesnei sąlyčio koncentracijai.
84. EBPO Rekomendaciniame dokumente Nr. 43 pateikiama informacija, padėsianti aiškinti dauginimosi ir neurotoksiškumo rezultatus (26).

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- (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 Prewaning 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, pp. 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 Spermatotoxicity 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) Šio priedo B.43 skyrius „Neurotoksiškumo graužikams bandymas“.
 - (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) Šio priedo B.53 skyrius „Neurotoksiškumo vystymuisi bandymas“.
 - (36) Šio priedo B.54 skyrius „Poveikiu graužikų gimdai pagrįstas biologinis tyrimas: Trumpalaikis estrogeninių savybių atrankos bandymas“.
 - (37) Šio priedo B.55 skyrius „Žiurkių Hershberger biologinis tyrimas: Trumpalaikis (anti)androgeninių savybių atrankos tyrimas“.
 - (38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation 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.
-

1 priedėlis

Per funkcinio stebėjimo bandymų rinkinio bandymus matuojami ir stebimi rodikliai (2A kohorta)

Nuolatinio laikymo narvelis ir atvira vieta	Manipuliaciniai	Fiziologiniai
Laikysena	Išėmimo lengvumas	Temperatūra
Nevalingi kloniniai ir toniniai judesiai	Manipuliavimo gyvūnu lengvumas	Kūno masė
Akies vokų užkirtimas	Raumens tonusas	Vyzdžio reakcija
Plaukų pašiaušimas	Reakcija į prisiartinimą	Vyzdžio dydis
Seilėjimasis	Reakcija į prisilietimą	
Ašarojimas	Reakcija į garsą	
Vokalizacija	Reakcija į uodegos suspaudimą	
Vaikščiojimas atbulomis	Reakcija išsitiesiant	
Eisenos anomalijos	Kreivai statoma pėda	
Budrumas	Priekinės galūnės grybšnio jėga	
Stereotipinis elgesys	Užpakalinės galūnės grybšnio jėga	
Keistas elgesys		
Dėmės		
Kvėpavimo anomalijos		

2 priedėlis

SĄVOKOS

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Bandomoji cheminė medžiaga: bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

B.57. H295R STEROIDOGENEZĖS ANALIZĖ

IVADAS

1. Šis bandymo metodas atitinka EBPO *Test Guideline* (TG) 456 (2011). 1998 m. EBPO iniciatyva pradėta labai svarbi veikla, kurios tikslas – patikslinti esamas ir parengti naujas galimų endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų atrankos ir bandymo gaires. 2002 m. EBPO konceptuali endokrininę sistemą ardančių cheminių medžiagų bandymo ir vertinimo sistema yra penkių lygmenų, kurių kiekvienas atitinka skirtingą biologinio sudėtingumo lygį (1). Atliekant šio bandymo metodo aprašyme apibūdinamą *in vitro* H295R steroidogenezės analizę, naudojama antinksčių žievės karcinomos pažeistų žmogaus ląstelių linija (NCI-H295R ląstelės), ir tai yra 2 lygmens (*in vitro* analizės mechanistiniams duomenims surinkti) analizė, kuri atliekama cheminių medžiagų atrankos ir vertinimo pirmenybės nustatymo tikslais. Ši analizė, kaip cheminės medžiagos poveikio steroidogenezėi, būtent 17 β -estradiolio (E2) ir testosterono gamybai, patikrinimo būdas, buvo kuriama ir standartizuojama keliais etapais. H295R analizė buvo optimizuota ir jos tinkamumas – patvirtintas (2) (3) (4) (5).
2. H295R steroidogenezės analizės tikslas – nustatyti chemines medžiagas, kurios veikia E2 ir testosterono gamybą. H295R analizę numatyta naudoti siekiant nustatyti ksenobiotikus, kurių taikiny (iai) – endogeniniai komponentai, lemiantys ląstelių viduje vykstančių biocheminių reakcijų seką, kuri prasideda cholesterolio reakcijų seka ir baigiasi E2 ir (arba) testosterono gamyba. H295R analizė nėra skirta cheminių medžiagų, kurios steroidogenezę veikia dėl savo poveikio pogumburio-hipofizės-gonadų (PHG) ašiai, nustatymui. Šios analizės tikslas – atsakyti, ar cheminė medžiaga gali indukuoti arba slopinti testosterono ir E2 gamybą, ar ne; tačiau kai kuriais atvejais (žr. 53 ir 54 punktus) galima gauti kiekybinius rezultatus. Analizės rezultatai išreiškiami santykiniais hormonų gamybos pokyčiais, palyginti su kontroliniais tirpikliais. Šia analize nesiekama gauti konkrečios mechanistinės informacijos apie bandomosios cheminės medžiagos sąveiką su endokrine sistema. Naudojant ląstelių liniją, buvo atlikti moksliniai tyrimai siekiant nustatyti konkrečių fermentų ir tarpinių hormonų, kaip antai progesterono, poveikį (2).
3. Šio bandymo metodo aprašyme vartojamų sąvokų ir santrumpų apibrėžtys pateiktos priedėlyje. Išsamus protokolą, įskaitant tirpalų ruošimo, ląstelių auginimo instrukcijas ir nurodymus dėl įvairių šio bandymo eigos aspektų, pateikiamas EBPO parengto dokumento *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production* (4) (Testosterono ir estradiolio gamybos modulatoriams nustatyti atliekamos H295R steroidogenezės analizės tinkamumo patvirtinimas keliose laboratorijose) I–III priedėliuose.

PRADINIAI ASPEKTAI IR APRIBOJIMAI

4. Lytinių steroidinių hormonų biosintezėje dalyvauja penki skirtingi fermentai, kurie katalizuoja šešias skirtingas reakcijas. Prie citochromo P450 (CYP) grupės priskiriamo cholesterolio šoninės grandinės skalumo fermento (CYP11A) sukeliamas cholesterolio virsmas į pregnenoloną yra pirmasis biocheminių reakcijų sekos, kuri baigiasi galutinių produktų steroidų sinteze, etapas. Atsižvelgiant į kitų dviejų reakcijų eilės tvarką, steroidogenezės reakcijų seka skyla į dvi reakcijų trajektorijas – Δ^5 -hidroksisteroidų reakcijų seką ir Δ^4 -ketosteroidų reakcijų seką, kurios susieina androstenediono gamybos etape (1 paveikslas).
5. 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenazės (17 β -HSD) veikiamas androstenedionas virsta į testosteroną. Testosteronas yra ir tarpinis junginys, ir hormonas galutinis produktas. Vyriškos lyties gyvūnų organizme testosteronas, veikiamas 5 α -reduktazės, kurios galima rasti androgeninio poveikio tikslinių audinių, kaip antai prostatos ir sėklinių pūslelių audinių ląstelių membranose, branduolio apvalkale ir endoplazminiame tinkle, gali virsti dihidrotestosteronu (DHT). DHT androgeninis poveikis gerokai stipresnis už testosterono, ir jis taip pat laikomas hormonu galutiniu produktu. H295R analizė nesuteikia galimybės nustatyti DHT koncentracijos (žr. 10 punktą).
6. Fermentas, kuris dalyvauja steroidogenezės reakcijų sekoje ir paverčia androgenines chemines medžiagas estrogenėmis, yra aromatazė (CYP19). CYP19 paverčia testosteroną 17 β -oestradioliu, o androstenedioną – estronu. E2 ir testosteronas laikomi hormonais steroidogenezės reakcijų sekos galutiniais produktais.
7. Skirtingų rūšių gyvūnų organizmuose CYP17, kaip liazės, poveikio tarpiniams substratams specifiskumas skiriasi. Žmogaus organizme šis fermentas teikia pirmenybę Δ^5 -hidroksisteroidų reakcijų sekos substratams (pregnenolonui), o žiurkės – Δ^4 -ketosteroidų reakcijų sekos substratams (progesteronui) (19). Tokiais CYP17, kaip liazės, poveikio skirtumais galima paaiškinti kai kuriuos nuo gyvūno rūšies priklausomus reakcijos į chemines medžiagas, kurios *in vivo* keičia steroidogenezę, skirtumus (6). Tyrimais nustatyta, kad H295 ląstelės tiksliausiai atspindi suaugusio žmogaus antinksčių fermentų ekspresijos ir steroidų gamybos ypatumus (20), tačiau žinoma, kad šios ląstelės ekspresuoja ir Δ^5 -hidroksisteroidų, ir Δ^4 -ketosteroidų reakcijų sekose, kurios baigiasi androgenų sinteze, dalyvaujančius fermentus (7) (11) (13) (15).

- nereikia naudoti gyvūnų;
- H295R ląstelių liniją galima įsigyti rinkoje.

10. Pagrindiniai analizės apribojimai:

- H295R analizės metabolinė geba nežinoma, bet ji tikriausiai yra palyginti nedidelė, todėl šia analize turbūt nepavyks nustatyti cheminių medžiagų, kurių metabolizmą reikia suaktyvinti.
- Kadangi H295R ląstelių linijos šaltinis – antinksčių audinys, joje yra fermentų, kurie gali gaminti gliukokortikoidus ir mineralkortikoidus, taip pat lytinius hormonus, todėl poveikis gliukokortikoidų ir mineralkortikoidų gamybai gali turėti įtaką analize nustatomi testosterono ir E2 koncentracijai.
- analizė nesuteikia galimybės nustatyti DHT koncentracijos, todėl manoma, kad šiuo bandymo metodu nebūtų įmanoma nustatyti cheminių medžiagų, kurios slopina 5 α -reduktazę, o tokiu atveju galima naudoti Hershbergerio analizę (16).
- Naudojant H295R analizės metodą, nepavyks nustatyti cheminių medžiagų, kurios trikdo steroidogenezę veikdamos pogumburio-hipofizės-gonadų (PHG) ašį, nes tokį tyrimą galima atlikti tik su neporuotais gyvūnais.

BANDYMO METODO PRINCIPAS

11. Analizės paskirtis – nustatyti chemines medžiagas, kurios veikia T ir E2 gamybą. Testosteronas taip pat yra tarpinis junginys E2 gamybos reakcijų sekoje. Naudojant šią analizę, galima nustatyti chemines medžiagas, kurios paprastai slopina arba indukuoja steroidogenezės reakcijų sekos fermentus.
12. Paprastai ši analizė atliekama standartinėmis ląstelių auginimo sąlygomis 24 duobučių kultūrų auginimo plokštelėse. Taip pat šiai analizei galima naudoti kitų dydžių plokšteles, tačiau pasėlio ir bandymo sąlygas reikėtų atitinkamai pakoreguoti siekiant išsaugoti atitiktą veiksmingumo kriterijams.
13. Praėjus 24 valandų aklimacijos daugiaduobėse plokštelėse laikotarpiui, ląstelės 48 valandas veikiamos septynių dydžių koncentracijos bandomąja chemine medžiaga ir kiekvienos koncentracijos cheminė medžiaga bandoma ne mažiau kaip trijose duobutėse. Fiksuotos koncentracijos tirpiklis ir žinomas hormonų gamybos inhibitorius ir induktorius naudojami kaip neigiami ir teigiami kontroliniai bandiniai. Pasibaigus veikimo chemine medžiaga laikui, terpė pašalinama iš visų plokštelės duobučių. Pašalinus terpę, nedelsiant analizuojamas kiekvienoje duobutėje esančių ląstelių gyvybingumas. Hormonų koncentraciją terpėje galima išmatuoti įvairiais būdais, pvz., naudojant hormonų matavimo rinkinius, kurių galima įsigyti rinkoje, ir (arba) instrumentiniais analizės metodais, pvz., taikant skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodą. Gauti analizės duomenys – pokytis kartais, lyginant su kontroliniu tirpikliu ir mažiausio pastebėto poveikio koncentracija (LOEC). Jeigu analizės rezultatai neigiami, didžiausia bandyta koncentracija nurodoma kaip nepastebėto poveikio koncentracija (NOEC). Išvados dėl cheminės medžiagos gebėjimo paveikti steroidogenezę turėtų būti pagrįstos ne mažiau kaip du kartus atskirai atliktais bandymais. Bandymą atliekant pirmą kartą, galima nustatyti koncentracijos intervalą, vėliau, bandymą atliekant antrą ir, jei taikoma, trečią kartą (jeigu iškyla tirpumo arba citotoksiškumo problemų arba manoma, kad cheminės medžiagos aktyvumas siekia bandytų koncentracijos lygių intervalo pabaigą) – pakoreguoti koncentraciją.

LĄSTELIŲ AUGINIMO MITYBOS TERPĖJE PROCESAS

Ląstelių linija

14. NCI-H295R ląstelių galima įsigyti iš biologinių išteklių centro „American Type Culture Collections“ (ATCC), pasirašius moksliniams tyrimams skirtų medžiagų perdavimo sutartį (angl. *Material Transfer Agreement*, MTA) ⁽¹⁾.

Išvadas

15. Kadangi ląstelėms senstant ir didėjant ląstelių pasažų skaičiui, jų gebėjimas gaminti E2 keičiasi (2), prieš naudojant ląsteles, jos turėtų būti auginamos mitybos terpėje pagal specialų protokolą, o pasažų skaičių nuo ląstelių atšildymo ir ląstelių pasažų skaičių tuo metu, kai jos užšaldomos ir padedamos saugojimui skystame azote, reikėtų užsirašyti. Pirmas skaičius rodo faktinį ląstelių pasažų skaičių, o antrasis – pasažų skaičių tuo metu, kai ląstelės buvo užšaldytos ir padėtos saugojimui. Pavyzdžiui, ląstelės, kurios buvo užšaldytos po penkto pasažo, atšildytos, tuomet vėl paaugintos mitybos terpėje ir padalytos tris kartus (4 pasažai, nes šviežiai atšildytos ląstelės laikomos pirmo pasažo ląstelėmis), bus paženklintos kaip 4,5 pasažas. Numeravimo sistemos pavyzdys pavaizduotas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) I priedėlyje.
16. Pradinė terpė naudojama kaip priedais papildytų ir užšaldymo terpių pagrindas. Priedais papildyta terpė būtina ląstelių auginimui. Užšaldymo terpė specialiai skirta tam, kad nepakenkiant ląstelėms būtų galima užšaldyti jas

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manasas (Virdžinija, JAV) [<http://www.lgcstandards-atcc.org/>].

ilgalaikiam saugojimui. Prieš naudojant auginimo terpės priedą „Nu-serum“ (arba panašų tokių pat savybių serumą, kurį naudojant gaunami duomenys atitinka bandymo atlikimo ir kokybės kontrolės (KK) reikalavimus), kuris yra priedais papildytos terpės sudedamoji dalis, reikėtų ištirti jame natūraliai esančių testosterono ir E2 koncentraciją. Kaip šie tirpalai ruošiami, aprašyta tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlyje.

17. Pradėjus auginti H295R ląstelių kultūrą iš originalios ATCC ląstelių grupės, ląstelės turėtų būti auginamos penkis pasažus (t. y. ląstelės padalijamos 4 kartus). Tuomet penkto pasažo ląstelės užšaldomos saugojimui skystame azote. Prieš užšaldant ląsteles, ankstesnio ketvirto pasažo ląstelių mėginys analizuojamas KK plokštelėje (žr. 36 ir 37 punktus), siekiant patikrinti, ar bazinė hormonų gamyba ir reakcija į teigiamus kontrolinius bandinius atitinka 5 lentelėje nurodytus analizės KK kriterijus.
18. H295R ląstelės turi būti auginamos mitybos terpėje, užšaldomos ir laikomos skystame azote siekiant užtikrinti, kad ląstelių auginimui ir naudojimui visada būtų atitinkamo pasažo ir (arba) amžiaus ląstelių. Didžiausias pasažų skaičius auginimui paėmus naują ⁽¹⁾ arba užšaldytą ⁽²⁾ ląstelių grupę, kad ląstelių kultūrą būtų galima naudoti H295R analizei, neturėtų viršyti 10. Pavyzdžiui, tinkamos būtų tos ląstelių iš po penkto pasažo užšaldytos ląstelių grupės kultūros, kurių pasažai būtų žymimi skaičių deriniais nuo 4.5 iki 10.5. Siekiant išauginti ląsteles iš šių užšaldytų ląstelių grupių, reikėtų vadovautis 19 punkte aprašytu procesu. Prieš naudojant šias ląsteles bandymams, jas reikėtų auginti mitybos terpėje dar ne mažiau kaip keturis (4) pasažus (4.5 pasažas).

Ląstelių auginimas iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros

19. Šis ląstelių auginimo iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros procesas taikomas, kai ląstelių auginimui ir bandymams iš skysto azoto išimama jame saugota nauja ląstelių grupė. Šis procesas išsamiai aprašytas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlyje. Ląstelės išimamos iš skysto azoto, kuriame jos buvo saugomos, greitai atšildomos, supilamos į centrifuginį mėgintuvėlį su priedais papildyta terpe, centrifuguojamos kambario temperatūroje, vėl suspenduojamos priedais papildytoje terpėje ir perkeliama į kultūrų auginimo kolbas. Kitą dieną terpę reikia pakeisti. H295R ląstelės auginamos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂ koncentracijai ore ir terpę atnaujinant 2–3 kartus per savaitę. Ląstelėms užpildžius maždaug 85–90 % kultūrų auginimo kolbos, jas reikėtų padalyti. Padalyti ląsteles būtina siekiant užtikrinti ląstelių sveikatą ir augimą ir kad būtų galima pasilikti ląstelių biologiniams tyrimams atlikti. Ląstelės tris kartus praplaunamos fosfatiniu buferiniu druskų tirpalu (FBDT, be Ca²⁺ Mg²⁺) ir atlaisvinamos iš kultūrų auginimo kolbos, į FBDT (be Ca²⁺ Mg²⁺) įpilant atitinkamo atskiriomojo fermento, pvz., tripsino. Ląstelėms atsiskyrus nuo kultūrų auginimo kolbos sienelių, nedelsiant reikėtų sustabdyti fermento veikimą, į kolbą įpilant priedais papildytos terpės, kurios kiekis turėtų būti 3 kartus didesnis už ląstelių apdorojimui naudoto fermento. Ląstelės supilamos į centrifuginį mėgintuvėlį, centrifuguojamos kambario temperatūroje, supernatantas pašalinamas, o nusėdusios ląstelės vėl suspenduojamos priedais papildytoje terpėje. Atitinkamas ląstelių tirpalo kiekis supilamas į naują kultūrų auginimo kolbą. Ląstelių tirpalo kiekį reikėtų pakoreguoti taip, kad kultūrų auginimo kolbą ląstelės užpildytų per 5–7 dienas. Rekomenduojamas persėjimo santykis 1:3–1:4. Plokštelę reikėtų atidžiai paženklinėti. Dabar ląstelės jau paruoštos naudojimui analizės tikslais, o ląstelių perteklių reikėtų užšaldyti skystame azote, kaip aprašyta 20 punkte.

H295R ląstelių užšaldymas (ląstelių paruošimas saugojimui skystame azote)

20. Siekiant paruošti H295R ląsteles užšaldymui, reikėtų vadovautis pirmiau aprašytu ląstelių padalijimo procesu iki pakartotinio centrifuginio mėgintuvėlio dugne nusėdusių ląstelių suspendavimo. Šiuo atveju nusėdusios ląstelės pakartotinai suspenduojamos užšaldymo terpėje. Tirpalas supilamas į atitinkamai paženklinatą kriogeninį buteliuką, kuris šaldomas – 80°C temperatūroje 24 valandas, vėliau perkeliama saugojimui į suskystintą azotą. Šis procesas išsamiai aprašytas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos III priedėlyje (4).

Bandymams skirtų ląstelių sėjimas plokštelėse ir paruošimas inkubavimui

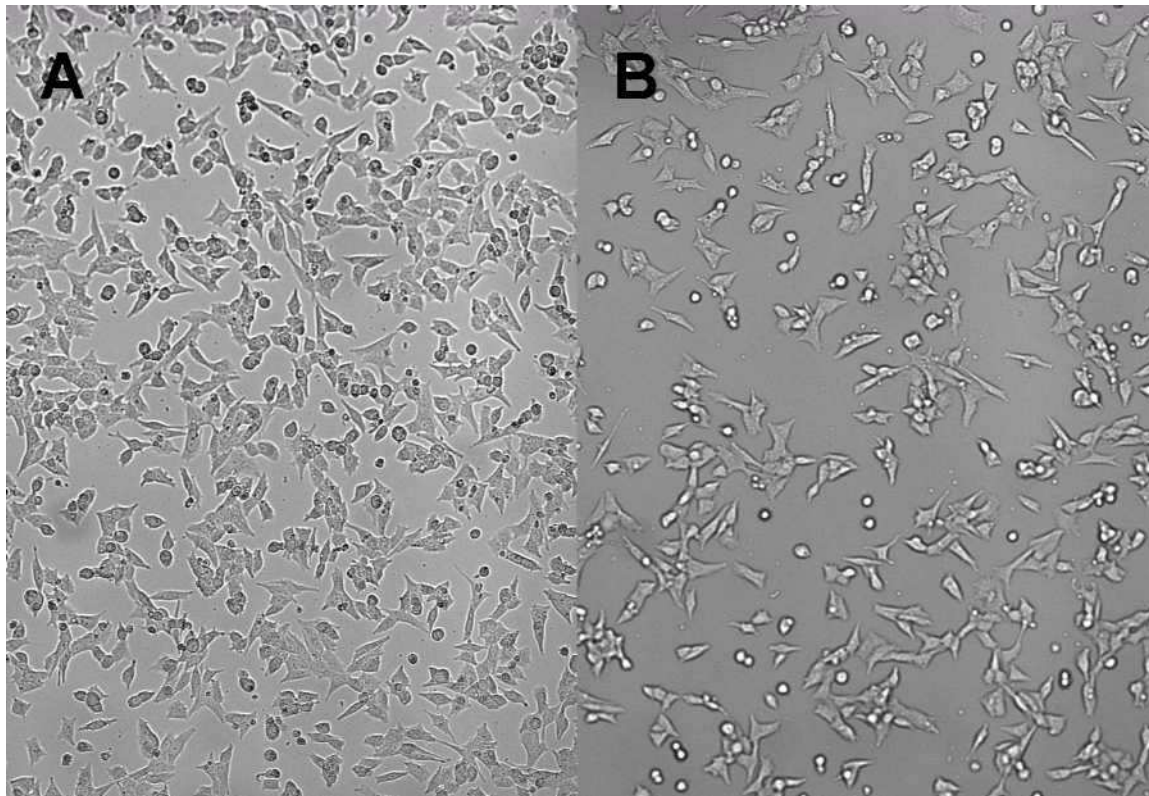
21. Kiek reikės pagal 19 punkte pateiktus nurodymus paruoštų 24 duobučių plokštelių, priklausys nuo cheminių medžiagų, kurių bandymus numatoma atlikti, skaičiaus ir kultūrų auginimo indų užpildymo ląstelėmis. Iš esmės ląstelių iš vienos (75 cm²) 80–90 % užpildytos kultūrų auginimo kolbos pakanka 1–1,5 (24 duobučių) plokštelės, kai tikslinis tankis – 200 000–300 000 ląstelių viename terpės mililitre; po 24 valandų duobutės užpildomos maždaug 50–60 %. Paprastai atliekant analizę tai yra optimalus ląstelių tankis hormonų gamybai. Esant didesniai tankiui, testosterono ir E2 gamybos ypatumai keičiasi. Prieš atliekant analizę pirmą kartą, rekomenduojama išbandyti skirtingus pasėlio tankius – nuo 200 000 iki 300 000 ląstelių viename mililitre, ir tolesniems eksperimentams rinktis tokį tankį, kurį naudojant po 24 valandų duobutė būtų užpildyta 50–60 %.

⁽¹⁾ Nauja ląstelių grupė – tai iš ATCC gauta šviežia ląstelių grupė.

⁽²⁾ Užšaldyta ląstelių grupė – tai ląstelės, kurios prieš tai buvo auginamos mitybos terpėje, vėliau užšaldytos laboratorijoje, bet ne ATCC.

2 paveikslas

H295R ląstelių, kurių pasėlio 24 duobučių plokštelėje tankis – 50 %, fotomikrografija, padaryta prie duobutės krašto (A) ir duobutės centre (B) praėjus 24 valandoms.



22. Terpė pipete ištraukiama iš kultūrų auginimo kolbos, o ląstelės tris kartus praplaunamos steriliu FBDT (be Ca^{2+} Mg^{2+}). Siekiant atskirti ląsteles nuo kultūrų auginimo kolbos sienelių, (į FBDT) įpilama fermento tirpalo. Praėjus atitinkamam laikotarpiui, per kurį ląstelės atsiskiria nuo kolbos sienelių, fermento veikimą reikėtų sustabdyti į kolbą įpilant priedais papildytos terpės, kurios kiekis turėtų būti 3 kartus didesnis už ląstelių apdorojimui naudoto fermento kiekį. Ląstelės supilamos į centrifuginį mėgintuvėlį, centrifuguojamos kambario temperatūroje, supernatantas pašalinamas, o nusėdusios ląstelės vėl suspenduojamos priedais papildytoje terpėje. Ląstelių tankis apskaičiuojamas naudojant, pvz., hemocitometrą arba ląstelių skaičiuotuvą. Ląstelių tirpalą reikėtų atskiesti iki naudojimui plokštelėse pageidaujamo tankio ir kruopščiai išmaišyti siekiant užtikrinti ląstelių tankio homogeniškumą. Ląsteles reikėtų pasėti plokštelėje, į kiekvieną duobutę įpilant po 1 ml ląstelių tirpalo, o plokšteles ir duobutes – paženklinėti. Plokštelės su pasėliu 24 valandas inkubuojamos 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO_2 koncentracijai ore, kad ląstelės galėtų prikibti prie duobučių.

KOKYBĖS KONTROLĖS REIKALAVIMAI

23. Labai svarbu, kad į duobutes būtų įpilta tiksliai tiek tirpalų ir mėginių, kiek reikia, nes nuo šių kiekių priklauso koncentracija, naudojama apskaičiuojant analizės rezultatus.
24. Prieš pradėdama auginti ląsteles mitybos terpėje ir atlikdama visus tolesnius bandymus, kiekviena laboratorija turėtų įrodyti, kad jų naudojama hormonų matavimo sistema yra jautri (29–31 punktai).
25. Jeigu hormonams matuoti numatoma naudoti antikūnais grindžiamus analizės metodus, prieš pradėdant bandymus, reikėtų ištirti, ar cheminės medžiagos, kurių bandymus numatoma atlikti, negali turėti neigiamos įtakos testosterono ir E2 kiekiui nustatyti naudojamos matavimo sistemos tikslumui, kaip išdėstyta 32 punkte.

26. Šiai analizei rekomenduojama kaip tirpiklį naudoti dimetilsulfoksidą (DMSO). Jeigu naudojamas kitas tirpiklis, reikia nustatyti:
- bandomosios cheminės medžiagos, forskolino ir prochlorazo tirpumą tirpiklyje;
 - citotoksiškumą, kaip tirpiklio koncentracijos funkciją.
- Rekomenduojama, kad didžiausia leidžiama tirpiklio koncentracija nevirsytų 10 kartų atskiestos mažiausio citotoksiškumo tirpiklio koncentracijos.
27. Prieš atlikdama bandymus pirmą kartą, laboratorija turėtų atlikti kvalifikacinį eksperimentą, kuris įrodytų, kad joje galima sukurti ir palaikyti atitinkamas ląstelių auginimo mitybos terpėje ir eksperimento sąlygas, kurios būtinos atliekant cheminių medžiagų bandymus, kaip aprašyta 33–35 punktuose.
28. Pradedant cheminių medžiagų bandymus su nauja ląstelių grupe, prieš pradedant naudoti naują ląstelių grupę, pasitelkus kontrolinę plokštelę reikėtų įvertinti ląstelių veiksmingumą, kaip aprašyta 36 ir 37 punktuose.

Hormonų matavimo sistemos veiksmingumas

Metodo jautrumas, patikimumas, tikslumas ir kryžminis reaktyvumas su mėginio matrica

29. Siekdama ištirti testosterono ir E2 gamybą H295R ląstelėse, kiekviena laboratorija gali naudoti savo pasirinktą hormonų matavimo sistemą, jeigu ji atitinka veiksmingumo kriterijus, įskaitant kiekybinio nustatymo ribą. Techniškai tai gali būti 100 pg/ml testosterono atveju ir 10 pg/ml E2 atveju; šie skaičiai grindžiami baziniais atliekant tinkamumo patvirtinimo tyrimus nustatytais hormonų kiekiais. Vis dėlto, atsižvelgiant į tai, koks bazinis hormonų kiekis nustatytas bandymus atliekančioje laboratorijoje, tinkama gali būti ir didesnė, ir mažesnė koncentracija. Prieš pradėdama naudoti KK plokšteles ir pradėdama bandymų serijas, laboratorija turėtų įrodyti, kad hormonų analize, kurią numatoma naudoti, t. y. analizuojant priedais papildytą terpę, į kurią suleista vidinio kontrolinio bandinio hormono, hormonų koncentraciją priedais papildytoje terpėje galima nustatyti taip patikimai ir tiksliai, kad analizė atitiktų 1 ir 5 lentelėse nurodytus KK kriterijus. Į priedais papildytą terpę reikia suleisti kiekvieno ne mažiau kaip trijų dydžių koncentracijos hormono (pvz., 100, 500 and 2 500 pg/ml testosterono; 10, 50 ir 250 pg/ml E2; arba galima naudoti mažiausios koncentracijos testosterono ir E2 preparatą, t. y. pasirinkti galimą mažiausią koncentraciją, apskaičiuotą pagal pasirinktos hormonų matavimo sistemos radimo ribas), ir ją reikėtų ištirti. Nustatyta hormonų koncentracija neekstrahuotuose mėginiuose turėtų skirtis nuo nominaliosios koncentracijos ne daugiau kaip 30 %, o pakartoti to paties mėginio matavimai neturėtų skirtis daugiau kaip 25 % (taip pat žr. papildomus KK kriterijus 8 lentelėje). Jeigu šie KK kriterijai įvykdyti, daroma prielaida, kad pasirinkta hormonų matavimo analizės sistema yra pakankamai patikima, tiksli ir kryžmiškai nereaguoja su terpės sudedamosiomis dalimis (mėginio matrica) taip, kad tai galėtų stipriai paveikti analizės rezultatus. Šiuo atveju prieš matuojant hormonus, ekstrahuoti mėginių nereikia.
30. Jeigu 1 ir 8 lentelėse nurodyti KK kriterijai neįvykdyti, gali pasireikšti stiprus matricos efektas, ir eksperimentą reikia atlikti su ekstrahuota terpe, į kuria buvo suleista vidinio kontrolinio bandinio hormono. Ekstrahavimo proceso pavyzdys aprašytas tinkamumo patvirtinimo ataskaitos II priedėlyje (4). Hormonų koncentraciją kiekviename ekstrahuotame mėginyje reikėtų matuoti trijose duobutėse⁽¹⁾. Jeigu galima įrodyti, kad po ekstrahavimo terpės sudedamosios dalys neturi neigiamos įtakos taikant hormonų nustatymo metodą atliekamų matavimų tikslumui, kaip apibrėžta KK kriterijuose, visi tolesni eksperimentai turėtų būti atliekami naudojant ekstrahuotus mėginius. Jeigu po ekstrahavimo KK kriterijai neįvykdomi, naudojama hormonų matavimo sistema yra netinkama H295R steroidogenezės analizei atlikti, todėl reikėtų naudoti kitą hormonų nustatymo metodą.

Standartinė kreivė

31. Hormonų koncentracija kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose (KBT) turėtų būti standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpoje. Būtų geriau, jei KBT reikšmės būtų išsidėsčiusios arti tiesinės koreliacijos atkarpos vidurio; tai užtikrintų galimybę išmatuoti, kaip stipriai indukuojama ir slopinama hormonų sintezė. Atsižvelgiant į tai, pasirenkamos praskiestos terpės (arba ekstraktai), kurias numatoma vertinti. Tiesinis ryšis nustatomas taikant atitinkamą statistinį metodą.

Cheminių medžiagų poveikio matavimų tikslumui bandymas

32. Jeigu hormonams matuoti numatoma naudoti antikūnais grindžiamus analizės metodus, pvz., imunofermentinės analizės sistemas (angl. ELISA) ir radioimuninės analizės metodus, prieš pradedant faktinius cheminių medžiagų bandymus, reikėtų ištirti kiekvieną cheminę medžiagą, kurios bandymus numatoma atlikti, siekiant nustatyti, ar ji negali turėti neigiamos įtakos hormonų matavimo sistemos tikslumui (tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlis, nes kai kurios cheminės medžiagos gali pakenkti šių bandymų tikslumui (17). Jeigu, atlikus hormonų analizę nustatoma, kad matavimo netikslumai testosterono ir (arba) E2 atveju atitinka arba viršija 20 % bazinės

⁽¹⁾ Pastaba. Jeigu ekstrahuoti būtina, kiekviename ekstrakte matavimai kartojami tris kartus. Kiekvienas mėginys ekstrahuojamas tik kartą.

hormonų gamybos, cheminės medžiagos poveikio hormonų analizės tikslumui bandymą (angl. *Chemical Hormone Assay Interference Test*, pvz., aprašytąjį tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlio 5.0 skyriuje) reikėtų atlikti su visais praskiestais pradiniais bandomųjų cheminių medžiagų tirpalais, kad būtų galima nustatyti slenkstinę dozę, kurią viršijus užfiksuojama didelių netikslumų (≥ 20 %). Jeigu matavimo netikslumai nesiekia 30 %, rezultatus galima pakoreguoti atsižvelgiant į poveikį matavimų tikslumui. Jeigu matavimo netikslumai viršija 30 %, duomenys negalioja ir šių dydžių koncentracijos analizės duomenis reikėtų atmesti. Jeigu esant skirtingai citotoksiško poveikio neturinčiai koncentracijai bandomoji cheminė medžiaga stipriai neigiamai veikia hormonų matavimo sistemos tikslumą, reikėtų naudoti kitą hormonų matavimo sistemą. Siekiant išvengti neigiamos cheminių medžiagų priemonių įtakos matavimų tikslumui, rekomenduojama iš terpės hormonus ekstrahuoti naudojant tinkamą tirpiklį; galimi metodai aprašyti tinkamumo patvirtinimo ataskaitoje (4).

1 lentelė

Hormonų matavimo sistemų veiksmingumo kriterijai

Parametras	Kriterijus
Matavimo metodo jautrumas	Kiekybinio nustatymo riba (LOQ) Testosteronas: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Hormonų ekstrahavimo veiksmingumas (tik kai ekstrahuoti būtina)	Vidutinis iš tirpalo regeneruotas hormono kiekis (remiantis trimis matavimais) nuo pridėto kiekio neturėtų skirtis daugiau kaip 30 %.
Cheminės medžiagos poveikis matavimų tikslumui (tik antikūnais grindžiamos sistemos)	Neturėtų būti stiprių (atitinkamo hormono atveju ≥ 30 % bazinio hormonų gamybos lygio) kryžminių reakcijų nė su vienu ląstelių gaminamu hormonu ^(b) ^(c)

^(a) Pastaba. Metodo matavimo ribos pagrįstos bazinio hormonų gamybos lygio reikšmėmis, kurios pateikiamos 5 lentelėje, ir priklauso nuo veiksmingumo. Jeigu galima pasiekti didesnę bazinį hormonų gamybos lygį, riba gali būti aukštesnė.

^(b) Esant didesniai procentiniam dydžiui, kai kurie testosterono antikūnai gali kryžmiškai reaguoti su androstendionu, o E2 antikūnai – su estronu. Tokiais atvejais neįmanoma tiksliai nustatyti poveikio 17 β -HSD. Vis dėlto šie duomenys gali suteikti naudingos informacijos apskritai apie poveikį estrogenų ar androgenų gamybai. Tokiais atvejais duomenis reikėtų išreikšti kaip androgenų ir (arba) estrogenų, o ne E2 ir testosterono reakciją.

^(c) Ląstelių gaminami hormonai: cholesterolis, pregnenolonas, progesteronas, 11-deoksikortikosteronas, kortikosteronas, aldosteronas, 17 α -pregnenolonas, 17 α -progesteronas, deoksikortizolis, kortizolis, DHEA, androstenedionas, estronas.

Laboratorijos kvalifikacinis bandymas

33. Prieš pradėdama nežinomų cheminių medžiagų bandymus, laboratorija, atlikdama laboratorijos kvalifikacinį bandymą, turėtų įrodyti, kad joje galima sukurti ir palaikyti atitinkamas ląstelių auginimo mitybos terpėje ir bandymų sąlygas, kurios būtinos siekiant sėkmingai atlikti analizę. Kadangi analizės atlikimo sėkmė tiesiogiai susijusi su analizę atliekančiais laboratorijos darbuotojais, įvykus laboratorijos personalo pokyčiams, šias procedūras reikėtų iš dalies pakartoti.
34. Šis kvalifikacinis bandymas atliekamas tokiomis pat sąlygomis, kurios išvardytos 38–40 punktuose: ląstelėse veikiamos 7 dydžių koncentracijos stipriais, vidutinio stiprumo ir silpnais induktoriais ir inhibitoriais, taip pat neigiamo krūvio chemine medžiaga (žr. 2 lentelę). Kaip matyti iš 2 lentelės, tarp cheminių medžiagų, kurių bandymus reikia atlikti – stiprus induktorius forskolinas (CAS Nr. 66575–29–9), stiprus inhibitorius prochlorazas (CAS Nr. 67747–09–5), vidutinio stiprumo induktorius atrazinas (CAS Nr. 1912–24–9), vidutinio stiprumo inhibitorius aminogliutetimidazas (CAS Nr. 125–84–8), silpnas E2 gamybos induktorius ir silpnas testostosterone gamybos inhibitorius bisfenolis A (CAS Nr. 80–05–7) ir neigiama cheminė medžiaga žmogaus choriono gonadotropinas (ŽCG) (CAS Nr. 9002–61–3). Visų cheminių medžiagų bandymai atliekami naudojant atskiras plokšteles, taip, kaip nurodyta 6 lentelėje. Atliekant bandymus su kvalifikaciniam bandymui skirtomis cheminėmis medžiagomis, kasdien naudojama po vieną KK plokštelę (4 lentelė, 36–37 punktai).

2 lentelė

Kvalifikaciniam bandymui skirtos cheminės medžiagos ir jų koncentracija

Kvalifikaciniam bandymui skirta cheminė medžiaga	Bandomoji koncentracija [μ M]
prochlorazas	0 ^(a) ; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10;
forskolinas	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30;

Kvalifikaciniam bandymui skirta cheminė medžiaga	Bandomoji koncentracija [µM]
atrazinas	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100;
aminogliutetimidaz	0 ^(a) ; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100;
bisfenolis 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) Kontrolinis bandinys tirpiklis (DMSO) (0), 1 µl DMSO/duobutėje.

Atliekant laboratorijos kvalifikacinį bandymą, kvalifikaciniam bandymui skirtų cheminių medžiagų poveikio H295R ląstelėms bandymas turėtų būti atliekamas 24 duobučių plokštelėse. Visos bandomųjų cheminių medžiagų dozės nurodomos µM. Dozės suleidžiamos į duobutes su 0,1 % t/t DMSO. Bandymai su kiekviena bandomąja koncentracija atliekami trijose duobutėse (6 lentelė). Kiekvienai cheminei medžiagai naudojamos atskiros plokštelės. Atliekant bandymus, kasdien naudojama po vieną KK plokštelę.

35. Ląstelių gyvybingumo ir hormonų analizės atliekamos, kaip nurodyta 42–46 punktuose. Slenkstinę vertę (mažiausią pastebėto poveikio koncentraciją, LOEC) ir sprendimą dėl klasifikacijos reikėtų nurodyti ataskaitoje ir palyginti su 3 lentelėje pateiktomis reikšmėmis. Duomenys laikomi priimtinais, jeigu jie atitinka 3 lentelėje nurodytą LOEC ir sprendimą dėl klasifikacijos.

3 lentelė

Kvalifikaciniam bandymui skirtų cheminių medžiagų slenkstinės vertės (LOECs) ir sprendimai dėl klasifikacijos

	CAS Nr.	LOEC [µM]		Sprendimas dėl klasifikacijos	
		testosteronas	E2	testosteronas	E2
prochlorazas	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ^(a) (slopinimas)	+ (slopinimas)
forskolinas	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (indukcija)	+ (indukcija)
atrazinas	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (indukcija)	+ (indukcija)
aminogliutetimidaz	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (inhibavimas)	+ (inhibavimas)
bisfenolis A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (inhibavimas)	+ (inhibavimas)
HCG	9002-61-3	netaikytina	netaikytina	neigiama	neigiama

(^a) + – teigiama

netaikytina – netaikytina, nes citotoksiško poveikio neturinti neigiamo kontrolinio bandinio koncentracija neturėtų sukelti pokyčių.

Kokybės kontrolės plokštelė

36. Kokybės kontrolės (KK) plokštelė naudojama siekiant patikrinti H295R ląstelių veiksmingumą standartinėmis ląstelių auginimo sąlygomis ir siekiant sukurti hormonų koncentracijos kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose, teigiamuose ir neigiamuose kontroliniuose bandiniuose ir kitų laikui bėgant vertinamų KK rodiklių istorinių duomenų bazę.
- KK plokštelėje H295R ląstelių veiksmingumas turėtų būti vertinamas kaskart kai imama nauja ATCC ląstelių grupė arba pirmą kartą panaudojus prieš tai užšaldytą pradinę ląstelių kultūrą, nebent su ta ląstelių grupe buvo atliekamas laboratorijos kvalifikacinis bandymas (32–34 punktai).
 - KK plokštelė suteikia galimybę išsamiai įvertinti analizės sąlygas (pvz., ląstelių gyvybingumą, kontrolinius bandinius tirpiklius, neigiamus ir teigiamus kontrolinius bandinius, taip pat atliekant vieną ir kelias analizes gaunamų duomenų kintamumą) atliekant cheminių medžiagų bandymus ir turi būti naudojama kaskart, kai atliekamas bandymas.
37. KK bandymas atliekamas 24 duobučių plokštelėje, vadovaujantis tais pačiais inkubavimo, dozavimo, ląstelių gyvybingumo (citotoksiškumo) vertinimo, hormonų ekstrahavimo ir hormonų analizės atliekant cheminių medžiagų bandymus procesais, kurie aprašyti 38–46 punktuose. QC plokštelėje yra duobučių su tirpalu tuštiesiems bandymams, kontroliniais bandiniais tirpikliais ir dviejų dydžių koncentracijos žinomam E2 ir testosterono sintezės

induktoriumi (forskolinu, 1; 10 μ M) ir inhibitoriumi (prochlorazu, 0,1; 1 μ M) Be to, atrinkose duobutėse kaip gyvybingumo (citotoksiškumo) analizės teigiamas kontrolinis bandinys naudojamas MeOH. 4 lentelėje pateikiamas išsamus išdėstymo plokštelėje aprašymas. Kriterijai, kurių reikia laikytis KK plokštelėje, išvardyti 5 lentelėje. Mažiausias bazinis hormonų testosterono ir E2 gamybos lygis turi būti pasiektas ir kontrolinio bandinio tirpiklio, ir tuščiajam bandymui skirtose duobutėse.

4 lentelė

Išdėstymas kokybės kontrolės plokštelėje, kai siekiama atlikti cheminėmis medžiagomis neveikiamų H295R ląstelių ir H295R ląstelių, veikiamų žinomais E2 ir testosterono gamybos inhibitoriais (PRO = prochlorazas) ir stimulatoriais (FOR = forskolinas), veiksmingumo bandymus. Užbaigus poveikio eksperimentą ir pašalinus terpę, į visas MeOH duobutes suleidžiama 70 % metanolio tirpalo, kuris naudojamas kaip teigiamas kontrolinis bandinys citotoksiškumui įvertinti (žr. citotoksiškumo analizę tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlyje).

	1	2	3	4	5	6
A	tuščiasis bandymas ^(a)	tuščiasis bandymas ^(a)	tuščiasis bandymas ^(a)	tuščiasis bandymas ^(a) (+ MeOH) ^(b)	tuščiasis bandymas ^(a) (+ MeOH) ^(b)	tuščiasis bandymas ^(a) (+ MeOH) ^(b)
B	DMSO ^(c) 1 μ l	DMSO ^(c) 1 μ l	DMSO ^(c) 1 μ l	DMSO ^(c) 1 μ l (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μ l (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 μ l (+ MeOH) ^(b)
C	FOR 1 μ M	FOR 1 μ M	FOR 1 μ M	PRO 0.1 μ M	PRO 0.1 μ M	PRO 0,1 μ M
D	FOR 10 μ M	FOR 10 μ M	FOR 10 μ M	PRO 1 μ M	PRO 1 μ M	PRO 1 μ M

^(a) Tuščiajam bandymui skirtose duobutėse esančioms ląstelėms suleidžiama tik terpės (t. y. be tirpiklio).

^(b) Metanolio (MeOH) suleidžiama **po to**, kai užbaigiamas poveikio bandymas ir terpė pašalinama iš šių duobučių.

^(c) Kontrolinis bandinys tirpiklis DMSO (po 1 μ l duobutėje).

5 lentelė

Kokybės kontrolės plokštelių veiksmingumo kriterijai

	Testosteronas	E2
Bazinis hormono gamybos lygis kontroliniame bandinyje tirpiklyje (KBT)	≥ 5 kartus viršija LOQ	$\geq 2,5$ karto viršija LOQ
Indukcija (10 μ M forskolino)	$\geq 1,5$ karto didesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT	$\geq 7,5$ karto didesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT
Inhibavimas (1 μ M prochlorazo)	$\leq 0,5$ karto mažesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT	$\leq 0,5$ karto mažesnė gamybos apimtis, palyginti su KBT

LAŠTELIŲ VEIKIMO CHEMINĖMIS MEDŽIAGOMIS PROCESAS

38. Prieš bandymą inkubuotos ląstelės išimamos iš inkubatoriaus (21 punktas) ir apžiūrimos po mikroskopu, siekiant prieš dozavimą įsitikinti, kad jų būklė (kibimas, morfologija) yra gera.
39. Ląstelės dedamos į mikrobiologinės saugos spintą, pašalinama priedais papildyta terpė ir ji pakeičiama nauja priedais papildyta terpe (po 1 ml duobutėje). Šiam bandymo metodui rekomenduojamas tirpiklis DMSO. Vis dėlto, jei yra priežasčių, dėl kurių reikėtų naudoti kitus tirpiklius, reikėtų aprašyti mokslinį loginį pagrindimą. Ląstelės veikiamos bandomąja chemine medžiaga, 1 μ l atitinkamo pradinio tirpalo su DMSO (žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlį) suleidžiant į 1 ml priedais papildytos terpės (duobutės tūris). Gaunama galutinė

DMSO koncentracija duobutėse – 0,1 %. Kad medžiagos gerai susimaišytų, paprastai rekomenduojama atitinkamą bandomosios cheminės medžiagos pradinį tirpalą su DMSO sumaišyti su priedais papildyta terpe, kad kiekvienoje dozėje būtų pageidaujama galutinė koncentracija, ir pašalinus seną terpę, tuo mišiniu nedelsiant pripildyti kiekvieną duobutę. Jeigu taikomas šis būdas, DMSO koncentracija (0,1 %) turėtų išlikti visoje duobutėje. Naudojant stereomikroskopą, apžiūrima, ar duobutėse, kuriose yra dviejų didžiausių dydžių koncentracija, nesusidarė nuosėdos ar drumzlės – tai reikėtų, kad bandomoji cheminė medžiaga ne visiškai ištirpo. Pastebėjus tokias savybes (drumzles, nuosėdas), duobutės su mažesnės koncentracijos medžiaga taip pat apžiūrimos (ir taip toliau), ir tie koncentracijos dydžiai, kuriems esant medžiagos nevysiškai ištirpo, išbraukiamos iš tolesnio vertinimo ir analizės. Plokštelė 48 valandoms gražinama į inkubatorių, kuriame palaikoma 37 °C temperatūra ir 5 % CO₂ koncentracija ore. Bandomosios cheminės medžiagos išdėstymas plokštelėje pateikiamas 6 lentelėje. Iš pradinių tirpalų, pažymėtų skaičiais nuo 1 iki 7 matyti, kokia tvarka bandomosios cheminės medžiagos dozė didėja.

6 lentelė

Bandomosios medžiagos, kuria veikiamos H295R ląstelės, dozavimo 24 duobučių plokštelėje schema

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	4 pradinis tirpalas	4 pradinis tirpalas	4 pradinis tirpalas
B	1 pradinis tirpalas	1 pradinis tirpalas	1 pradinis tirpalas	5 pradinis tirpalas	5 pradinis tirpalas	5 pradinis tirpalas
C	2 pradinis tirpalas	2 pradinis tirpalas	2 pradinis tirpalas	6 pradinis tirpalas	6 pradinis tirpalas	6 pradinis tirpalas
D	3 pradinis tirpalas	3 pradinis tirpalas	3 pradinis tirpalas	7 pradinis tirpalas	7 pradinis tirpalas	7 pradinis tirpalas

40. Po 48 valandų plokštelės, kuriose ląstelės buvo veikiamos cheminėmis medžiagomis, išimamos iš inkubatoriaus; per mikroskopą įvertinama kiekvienoje duobutėje esančių ląstelių būklė (kibimas, morfologija, užpildymo laipsnis) ir apžiūrima, ar nėra citotoksiškumo požymių. Terpė iš kiekvienos duobutės padalijama į dvi vienodas dalis (po maždaug 490 µl) ir jos perkeliamos į du atskirus atitinkamai paženklintus buteliukus (t. y. vienas bandinys bus naudojamas kaip atsarginis terpės iš kiekvienos duobutės ėminys). Kad ląstelės neišdžiūtų, terpė sykiu pašalinama iš vienos eilutės arba stulpelio duobučių ir pakeičiama ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizei skirta terpė. Jeigu ląstelių gyvybingumą ir (arba) citotoksiškumą numatoma vertinti ne tuoj pat, o vėliau, kiekviena duobutė papildoma FBDT su Ca²⁺ ir Mg²⁺. Terpės užšaldomos – 80 °C temperatūroje ir saugomos iki tolesnio jų apdoravimo siekiant ištirti hormonų koncentraciją (žr. 44–46 punktus). Nors – 80 °C temperatūroje saugomoje terpėje esantys testosteronas ir E2 yra iš esmės stabilūs ne mažiau kaip 3 mėnesius, kiekvienoje laboratorijoje hormonų stabilumas saugojimo laikotarpiu turėtų būti patvirtintas dokumentais.
41. Pašalinus terpę, nedelsiant nustatomas kiekvienoje plokštelėje, kurioje ląstelės buvo veikiamos cheminėmis medžiagomis, esančių ląstelių gyvybingumas ir (arba) pasireiškęs citotoksiškumas.

Ląstelių gyvybingumo nustatymas

42. Pasirinktu ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizės metodu galima nustatyti galimą bandomosios cheminės medžiagos poveikį ląstelių gyvybingumui. Naudojant šį analizės metodą, turėtų būti galimybė tiksliai nustatyti duobutėje esančių gyvybingų ląstelių procentinę dalį, arba reikėtų įrodyti, kad ši analizė yra tiesiogiai palyginama su analizės sistema *Live/Dead®* (jos tiesine funkcija) (žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlį). Kitas analizės metodas, kuris yra toks pat veiksmingas, – tai MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido) bandymas (18). Ląstelių gyvybingumo vertinimas naudojant minėtus metodus yra santykinis vertinimas, kuris nebūtinai turi patvirtinti tiesinį ryšį su visomis duobutėje esančiomis ląstelėmis. Todėl chemikai laborantai turėtų lygiagrečiai subjektyviai vizualiai įvertinti kiekvieną duobutę, padaryti ir archyve išsaugoti skaitmenines kontrolinių bandinių tirpiklių ir dviejų didžiausių dydžių netoksiškos koncentracijos tirpalų nuotraukas, kad vėliau būtų galima įvertinti tikslų ląstelių tankį, jei to prireiktų. Jeigu pažiūrėjus matyti arba gyvybingumo ir (ar) citotoksiškumo analizė patvirtina, kad ląstelių skaičius padidėjo, įtariamą padidėjimą reikia patikrinti ir patvirtinti. Jeigu ląstelių skaičiaus padidėjimas patvirtinamas, tai reikėtų nurodyti bandymo ataskaitoje. Ląstelių gyvybingumas išreiškiamas santykiu su vidutiniu kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose nustatytu atsaku, t. y. 100 % ląstelių gyvybingumu, ir apskaičiuojamas pagal naudotą ląstelių gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizės metodą. Atliekant MTT analizę, galima naudoti šią formulę:

% gyvybingų ląstelių = (atsakas duobutėje – vidutinis atsakas MeOH apdorotose [= 100 % žuvusių ląstelių] duobutėse) ÷ (vidutinis atsakas KBT duobutėse – vidutinis atsakas MeOH apdorotose [= 100 % žuvusių ląstelių] duobutėse)

43. Duobutės, kuriose ląstelių gyvybingumas (palyginti su vidutiniu gyvybingumu kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose, t. y. 100 % gyvybingumu), yra mažesnis nei 80 %, neturėtų būti įtraukiamos į galutinę duomenų analizę. Jeigu steroidogenezė slopinama esant beveik 20 % citotoksiškumui, tai reikėtų atidžiai įvertinti, siekiant įsitikinti, kad citotoksiškumas nėra inhibavimo priežastis.

Hormonų analizė

44. Testosterono ir E2 analizei kiekviena laboratorija gali naudoti savo pasirinktą hormonų matavimo sistemą. Atsarginius terpės mėginius iš kiekvienos gydymo grupės galima naudoti tirpalų praskiedimui, kad koncentracija patektų į standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpą. Kaip minėta 29 punkte, kiekviena laboratorija, prieš atlikdama KK bandymus arba bandydama chemines medžiagas, turėtų priedais papildytos terpės, į kurią suleista vidinio kontrolinio bandinio hormono, analize įrodyti, kad jos naudojama hormonų matavimo sistema (pvz., ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) atitinka KK kriterijus. Siekiant užtikrinti, kad bandymo sistemos sudedamosios dalys nedarytų neigiamos įtakos hormonų matavimų tikslumui, prieš atliekant hormonų matavimus, juos gali tekti ekstrahuoti iš terpių (žr. sąlygas, kuriomis mėginius ekstrahuoti būtina arba ne, 30 punkte). Ekstrahuoti mėginius rekomenduojama vadovaujantis tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlyje nurodyta tvarka.
45. Jeigu hormonų gamybai įvertinti naudojamas komercinis bandymų rinkinys, hormonų analizę reikėtų atlikti taip, kaip nurodyta bandymų rinkinio gamintojo parengtoje instrukcijoje. Dauguma gamintojų yra sukūrę unikalią procedūrą, pagal kurią atliekamos hormonų analizės. Praskiestus mėginius reikia pakoreguoti taip, kad numatyta hormonų koncentracija kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose išsidėstytų apie pavienės analizės standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpos vidurį (tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlis). Į standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpą nepatekusias reikšmes reikėtų atmesti.
46. Galutinė hormonų koncentracija apskaičiuojama taip:

Pavyzdys

Ekstrahuota:	450 µl terpės
Atskiesta:	250 µl analizės buferiniame tirpale
Praskiesta atliekant analizę	santykiu 1:10 (kad mėginys patektų į standartinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpą)
Hormonų koncentracija atliekant analizę:	150 pg/ml (jau pakoreguota pagal koncentraciją mililitrui analizuoto mėginio)
Regeneruota:	89 %
Galutinė hormonų koncentracija	(hormonų koncentracija (vienne mililitre) ÷ regeneruota dalis) (praskiedimo faktorius)
Galutinė hormonų koncentracija	$(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10 = 936,3 \text{ pg/ml}$

Bandomosios koncentracijos pasirinkimas

47. Analizę turėtų būti atliekama ne mažiau kaip du kartus. Jeigu bandomosios koncentracijos dydžių negalima pasirinkti remiantis anksčiau gauta informacija, pvz., informacija apie tirpumo ribas arba citotoksiškumą, analizę atliekant pirmą kartą, rekomenduojama bandomąją koncentraciją išdėstyti dešimtainio logaritmo ($\log_{10}$) intervalais, kai 10^{-3} M – didžiausia koncentracija. Jeigu cheminė medžiaga yra tirpi ir necitotoksiška esant jokiai bandomajai koncentracijai ir pirmąkart atliekant analizę su bet kurio dydžio koncentracijos tirpalu, rezultatai buvo neigiami, tuomet tai reikia patvirtinti dar viena analize tokiais pat sąlygomis, kokiomis buvo atlikta pirmoji (7 lentelė). Jeigu pirmąkart atlikus analizę, gauti rezultatai yra *dviprasmiški* (t. y. kartais išreikštas pokytis yra statistiškai

reikšmingas, palyginti su KBT, naudojant tik vieno dydžio koncentraciją) arba teigiami (t. y. kartais išreikštas pokytis naudojant dviejų ar gretimų dydžių koncentraciją yra statistiškai reikšmingas), bandymą reikėtų pakartoti, kaip nurodyta 7 lentelėje, patikslinus pasirinktus bandomosios koncentracijos dydžius. Analizę atliekant antrą ir trečią kartą (jei taikytina), bandomąją koncentraciją reikėtų pakoreguoti remiantis pirmąkart atliktos analizės rezultatais, koncentracijos dydžius išdėstant per 1/2-log nuo poveikį sukėlusios koncentracijos (pvz., jeigu atliekant pirminę analizę su 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 µM koncentracijos tirpalais, indukcinis poveikis pasireiškė esant 1 ir 10 µM koncentracijai, antrąkart reikėtų bandyti tokių dydžių koncentraciją: 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 µM), nebent reikia mažesnės koncentracijos LOEC pasiekti. Pastaruoju atveju, analizę atliekant antrą kartą reikėtų naudoti ne mažiau kaip penkių dydžių koncentraciją, mažesnę už pirmąkart naudotą mažiausią koncentraciją, taikant 1/2-log skalę. Jeigu antrą kartą atlikta analizė nepatvirtina pirmąkart atliktos analizės rezultatų (t. y. naudojant koncentraciją, kuri ± 1 skiriasi nuo prieš tai bandytos koncentracijos, kurios analizės rezultatai buvo teigiami, statistiškai reikšmingų rezultatų negauta), pirminio bandymo sąlygomis reikia atlikti trečią bandymą. Pirmą kartą atlikus analizę gauti dviprasmiški rezultatai laikomi neigiamais, jeigu nė viena iš dviejų tolesnių analizių nepatvirtino nustatyto poveikio. Dviprasmiškai rezultatai laikomi teigiamu atsaku (poveikiu), jeigu atsaką galima patvirtinti bent dar vienąkart atlikta analize, koncentraciją pakoregavus ± 1 (žr. 55 skyrių „Duomenų aiškinimo tvarka“).

7 lentelė

Sprendimų matrica pagal galimus rezultatų scenarijus

1 bandymo kartas	2 bandymo kartas		3 bandymo kartas		Sprendimas	
Scenarijus	Sprendimas	Scenarijus	Sprendimas	Scenarijus	Teigiamas	Neigiamas
Rezultatai neigiami	Patvirtinti ^(a)	Rezultatai teigiami	Nutraukti			X
Rezultatai neigiami	Patvirtinti ^(a)	Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ^(b)	Rezultatai neigiami		X
Rezultatai dviprasmiški ^(c)	Atlikti išsamesnę analizę ^(b)	Rezultatai neigiami	Patvirtinti ^(a)	Rezultatai neigiami		X
Rezultatai dviprasmiški ^(c)	Atlikti išsamesnę analizę ^(b)	Rezultatai neigiami	Patvirtinti ^(a)	Rezultatai teigiami	X	
Rezultatai dviprasmiški ^(c)	Atlikti išsamesnę analizę ^(b)	Rezultatai teigiami			X	
Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ^(b)	Rezultatai neigiami	Patvirtinti ^(a)	Rezultatai teigiami	X	
Rezultatai neigiami	Patvirtinti ^(a)	Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ^(b)	Rezultatai teigiami	X	
Rezultatai teigiami	Atlikti išsamesnę analizę ^(b)	Rezultatai teigiami	Nutraukti		X	

^(a) Patvirtinti ankstesnio bandymo karto rezultatus taikant tokį pat eksperimento modelį.

^(b) Pakartoti analizę koncentracijos dydžius išdėstant kas 1/2-log (pasirenkant koncentracijos dydžius, kurie nedaug skiriasi nuo koncentracijos, kurios bandymo rezultatai atliekant ankstesnį eksperimentą buvo visai kitokie).

^(c) Kartais išreikštas pokytis esant vienai koncentracijai statistiškai reikšmingai skiriasi, lyginant su KBT.

Bandymo plokštelės kokybės kontrolė

48. Be kriterijų, kurie keliami KK plokštelei, reikia laikytis ir kitų kokybės kriterijų, susijusių su priimtinu rezultatų kintamumu kartojant eksperimentą toje pačioje duobutėje, atliekant kartotinius bandymus, hormonų matavimo sistemų tiesinės priklausomybės ir jautrumo kintamumu, rezultatų kintamumu pakartotinai matuojant hormonų koncentraciją tame pačiame mėginyje (jei taikytina, žr. 30 punktą dėl ekstrahavimui keliamų reikalavimų) ir po terpės ekstrahavimo regeneruoto papildomai suleisto hormono procentinės dalies kintamumu; šie kriterijai pateikiami 8 lentelėje. Jeigu šie kriterijai neįvykdyti, skaičiuoklėje reikėtų nurodyti, jog susijusio mėginio atveju KK kriterijai nebuvo įvykdyti, ir reikėtų atlikti pakartotinę mėginio analizę arba išbraukti to mėginio duomenis iš duomenų aibės.

8 lentelė.

Priimtini H295R analizės bandymų plokštelės parametrų intervalai ir (arba) kintamumas (%)

LOQ: hormonų matavimo sistemos LOQ VK: variacijos koeficientas; KBT: kontrolinis bandinys tirpiklis;
SSPM: skilimų skaičius per minutę.

	Lyginama	Testosteronas	E2
Bazinis hormonų gamybos lygis kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose	Kartais didesnis už LOQ	≥ 5 kartus	≥ 2,5 karto
Poveikio bandymai – Variacijos kontroliniuose bandiniuose tirpikliuose toje pačioje plokštelėje koeficientai (toje pačioje duobutėje)	Absoliučioji koncentracija	≤ 30 %	≤ 30 %
Poveikio eksperimentai – KBT skirtingose plokštelėse VK (kartotiniai eksperimentai)	Pokytis kartais	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormonų matavimo sistema – jautrumas	Nustatomas sumažėjimas kartais, palyginti su KBT	≥ 5 kartus	≥ 2,5 karto
Hormonų matavimo sistema – Kartotinių KBT rodiklių VK ^(a)	Absoliučioji koncentracija	≤ 25 %	≤ 25 %
Terpės ekstrahavimas– Vidinio 3H etalono regeneravimas (jei taikytina)	SSPM	≥ 65 % nominaliosios reikšmės	

(^a) Kartotiniai to paties mėginio rodikliai.

DUOMENŲ ANALIZĖ IR TEIKIMAS

Duomenų analizė

49. Siekiant įvertinti santykinę cheminėmis priemonėmis pakeisto hormonų gamybos lygio padidėjimą ir (arba) sumažėjimą, rezultatus reikia normalizuoti pagal vidutinę KBT vertę kiekvienoje bandomojoje plokštelėje, o rezultatus reikėtų išreikšti pokyčiu, lyginant su KBT kiekvienoje bandomojoje plokštelėje. Visi duomenys išreiškiami kaip vidurkis ± 1 standartinis nuokrypis (SN).
50. Į duomenų analizę įtraukiami tik tų duobučių hormonų duomenys, kuriose citotoksiškumas buvo mažesnis nei 20 %. Santykiniai pokyčiai apskaičiuojami taip:

Santykinis pokytis = (hormonų koncentracija kiekvienoje duobutėje) ÷ (vidutinė hormonų koncentracija visose duobutėse su kontroliniu bandiniu tirpikliu)

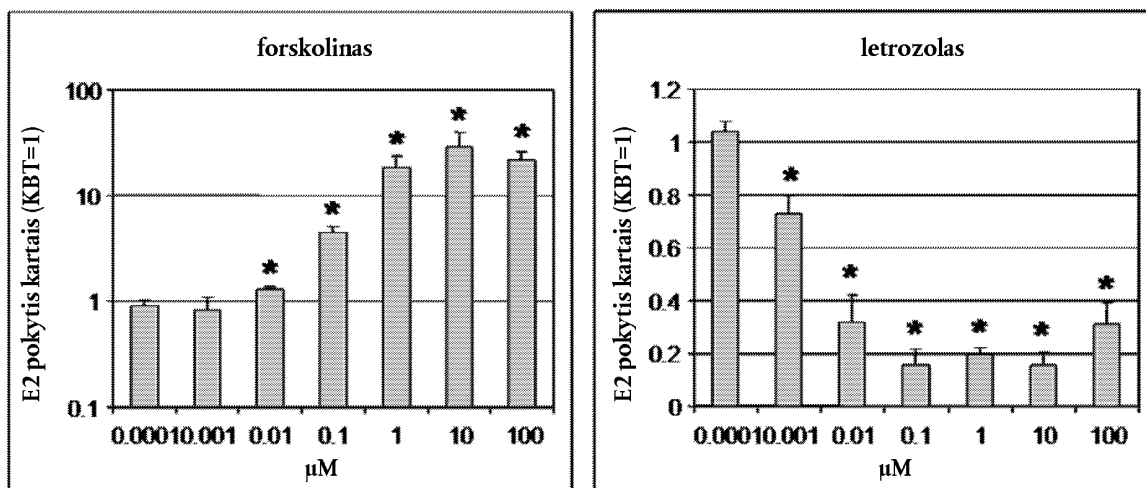
51. Jeigu pažiūrėjus į duobutę matyti arba 42 punkte aprašyta gyvybingumo ir (arba) citotoksiškumo analizė patvirtina, kad ląstelių skaičius padidėjo, tariamą padidėjimą reikia patikrinti ir patvirtinti. Jeigu ląstelių skaičiaus padidėjimas patvirtinamas, tai reikėtų nurodyti bandymo ataskaitoje.
52. Prieš atliekant statistines analizes, reikėtų įvertinti prielaidas dėl normalumo ir sklaidos homogeniškumo. Normališkumą reikėtų vertinti naudojant standartinius tikimybių grafikus ar kitus atitinkamus statistinius metodus (pvz., Šapiro ir Vilko (*Shapiro-Wilk*) kriterijų. Jeigu duomenys (pokyčiai kartais) nenormaliai pasiskirstę, reikėtų pamėginti transformuoti duomenis, kad jie priartėtų prie normaliojo skirstinio. Jeigu duomenys normaliai pasiskirstę arba artėja prie normaliojo skirstinio, skirtumus tarp cheminių medžiagų koncentracijos grupių ir kontrolinių bandinių tirpiklių reikėtų analizuoti naudojant parametrinį kriterijų (pvz., Duneto (*Dunnett*) kriterijų), kai koncentracija – nepriklausomas kintamasis, o atsakas (pokytis kartais) – priklausomas kintamasis. Jeigu duomenys pasiskirstę nenormaliai, reikėtų naudoti atitinkamą nparametrinį kriterijų (pvz., Kruskalo ir Voliso (*Kruskal Wallis*) kriterijų, Stylo kelių pusių-vienpusį kriterijų (angl. *Steel's Many-one rank test*); skirtumai laikomi reikšmingais kai $p \leq 0,05$. Statistiniai vertinimai atliekami remiantis vidutinėmis kiekvienos duobutės reikšmėmis, kurios atspindi nepriklausomus pakartotinius duomenų taškus. Manoma, kad dėl didelio dozių intervalo bandymą atliekant pirmą kartą ($\log_{10}$ pagrįsta sklaida) daugeliu atveju nebus galimybės aprašyti aiškaus koncentracijos ir atsako ryšio, kai dvi didžiausios dozės yra ant sigmoidinės kreivės tiesinės koreliacijos atkarpos. Todėl analizuojant pirmo bandymo karto ar bet kurias kitas duomenų aibes, kuriose bus ši sąlyga (pvz., kur negalima įvertinti didžiausio veiksmingumo), bus taikoma I tipo fiksuotų kintamųjų statistika, kaip aprašyta pirmiau.

53. Jeigu kreivės tiesinės koreliacijos atkarpoje yra daugiau kaip du duomenų taškai ir kai galima apskaičiuoti didžiausią veiksmingumą – kaip numatoma kai kurių antrą kartą atliekamų bandymų, kai koncentracijos dydžiai išdėliojami kas pusę logaritmo, atveju – veiksmingai koncentracijai (pvz., VK50 ir VK20) apskaičiuoti, reikėtų naudoti probito, logito arba kitą atitinkamą regresijos modelį.
54. Rezultatus reikėtų pateikti ir grafikų (diagramų, kuriose pavaizduotas vidurkis ± 1 SN), ir lentelių (LOEC, NOEC, poveikio kryptis ir didžiausio atsako stiprumas, kuris yra dozės ir atsako santykio duomenų aibės dalis) forma (žr. pavyzdį 3 paveiksle). Duomenų vertinimas laikomas patikimu, jeigu jis pagrįstas ne mažiau kaip du kartus atliktais nepriklausomais bandymais. Eksperimentas arba bandymo kartas laikomas nepriklausomu, jeigu jis atliktas skirtingomis datomis naudojant naują tirpalų ir kontrolinių bandinių rinkinį. Bandymą atliekant antrą ir trečią kartą (jei reikia), koncentracijos intervalą galima pakoreguoti remiantis pirmo bandymo karto rezultatais, siekiant tiksliau apibrėžti dozės ir atsako santykio intervalą, kuriame yra LOEC (žr. 47 punktą).

3 paveikslas

Duomenų, gautų atlikus H295R analizę, vertinimo ir pateikimo grafiko ir lentelės forma pavyzdys.

Žvaigždutė rodo statistškai reikšmingus skirtumus, palyginti su KBT ($p < 0,05$). LOEC: mažiausio pastebėto poveikio koncentracija; Didžiausias pokytis: didžiausias atsako, stebėto esant bet kuriai koncentracijai, stiprumas, palyginti su vidutiniu atsaku KBT (= 1).



Cheminė medžiaga	LOEC	Didžiausias pokytis
Forskolinas	0,01	0,15 karto
Letrozolas	0,001	29 kartus

Duomenų aiškinimo tvarka

55. Bandomoji cheminė medžiaga laikoma teigiama, jeigu kartais išreikšta indukcija statistiškai skiriasi ($p \leq 0,05$) nuo KBT esant dviejų gretutinių dydžių koncentracijai atlikus nepriklausomus bandymus ne mažiau kaip du kartus (7 lentelė). Bandomoji cheminė medžiaga laikoma neigiama, jeigu atlikus nepriklausomus bandymus du kartus, jų rezultatai buvo neigiami, arba jeigu atlikus nepriklausomus tris kartus, dviejų iš jų rezultatai buvo neigiami, o vieno – dviprasmiški arba teigiami. Jeigu trijų nepriklausomų eksperimentų metu gauti duomenys neatitinka 7 lentelėje išvardytų sprendimo kriterijų, eksperimentų rezultatai priskiriami prie neaiškintinų duomenų. Rezultatų, kurie gauti koncentracijai viršijant tirpumo ribas arba esant citotoksiškai koncentracijai, negalima įtraukti į rezultatų aiškinimą.

Bandymo ataskaita

56. Bandymo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Bandymą atliekanti įstaiga

- įstaigos pavadinimas ir vieta;
- tyrimo vadovas, kiti personalo nariai ir jų pareigos atliekant tyrimą;
- tyrimo pradžios ir pabaigos datos.

Bandomoji cheminė medžiaga, reagentai ir kontroliniai bandiniai

- Identifikaciniai duomenys (pavadinimas ir (arba) atitinkamas CAS Nr.), šaltinis, serijos ir (arba) partijos numeris, grynumas, tiekėjas ir bandomosios cheminės medžiagos, reagentų ir kontrolinių bandinių apibūdinimas;
- bandomosios cheminės medžiagos fizinis pobūdis ir atitinkamos fizikinės ir cheminės savybės;
- bandomųjų cheminių medžiagų, reagentų ir kontrolinių bandinių saugojimo sąlygos bei paruošimo būdas ir dažnis;
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas.

Ląstelės

- Ląstelių šaltinis ir rūšis;
- bandyme naudojamų ląstelių pasąž skaičius (ląstelių pasąž identifikacinis žymėjimas);
- ląstelių kultūrų priežiūros tvarkos aprašymas.

Prieš atliekant bandymą keliami reikalavimai (jei taikytina)

- Cheminės medžiagos poveikio hormonų analizės tikslumui bandymo aprašymas ir rezultatai;
- hormonų ekstrahavimo veiksmingumo matavimų aprašymas ir rezultatai;
- visų analitinių analizių, kurias numatoma atlikti, standartinė ir kalibravimo kreivės;
- pasirinktų analitinių analizių aptikimo ribos.

Bandymo sąlygos

- Terpės sudėtis;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracija;
- ląstelių tankis (apskaičiuota arba nustatyta ląstelių koncentracija po 24 ir 48 valandų);
- bandomosios cheminės medžiagos tirpumas (tirpumo riba, jei nustatyta);
- inkubavimo laikas ir sąlygos.

Bandymo rezultatai

- Neapdoroti kiekvienoje duobutėje esančio kontrolinio bandinio ir bandomųjų cheminių medžiagų duomenys: pasikartojantys rodikliai originalių duomenų, užfiksuotų prietaisu, kuriuo matuojama hormonų gamybos apimtis, forma (pvz., OD, fluorescenciniai vienetai, SSPM ir kt.);
- skirstinio normališkumo patvirtinimas arba duomenų transformacijos paaiškinimas;
- vidutinis atsakas ± 1 SN kiekvienoje duobutėje, kuri buvo vertinta;
- citotoksiškumo duomenys (bandomoji koncentracija, kuri sukėlė citotoksiškumą);
- patvirtinimas, kad KK reikalavimai įvykdyti;
- santykinis pokytis, palyginti su KBT, pakoreguotas atsižvelgiant į citotoksiškumą;
- diagrama, kurioje pavaizduotas santykinis pokytis (pokytis kartais) esant kiekvienai koncentracijai, SN ir statistinio reikšmingumo lygiui, kaip nurodyta 49–54 punktuose.

Duomenų aiškinimas

- Vadovaudamiesi nustatyta tvarka, paaiškinkite rezultatus ir aptarkite nustatytus faktus.

Rezultatų aptarimas

- Ar atsižvelgiant į tyrimo duomenis, yra požymių, rodančių, kad netiesioginis poveikis gliukokortikoidų ir mineralokortikoidų reakcijų sekoms galėjo paveikti testosterono ir E2 duomenis?

Išvados

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- (1) OECD (2002) OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, šio priedo B.54 skyriaus 2 priedėlyje.
- (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 steroidogenesis 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. Available at 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. Available at: 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, Available at: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvsv/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.
- (10) 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) Chapter B.55 of this Annex: Hershberger Bioassay in Rats: A short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.
- (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.
-

Priedėlis

SĄVOKOS

Užpildymas – ląstelių užimama ploto dalis arba leidžiama proliferacijos apimtis mitybos terpėje.

Cheminė medžiaga – medžiaga arba mišinys.

VK – variacijos koeficientas; tai – skirstinio standartinio nuokrypio ir jo aritmetinio vidurkio santykis.

CYP – (angl. *cytochrome P450*) citochromo P 450 monooksigenazės; tai – genų grupė ir dėl jų gaminami fermentai, kurie dalyvauja katalizuojant labai daug įvairių biocheminių reakcijų, įskaitant steroidinių hormonų sintezę ir metabolizmą.

SSPM – skilimų skaičius per minutę; tai – per minutę tam tikrame radioaktyviosios medžiagos kiekyje skilusių atomų skaičius.

E2 – 17β-oestradiolis, svarbiausias estrogenas žinduolių sistemose.

H295R ląstelės – žmogaus antinksčių žievės karcinomos ląstelės, kurios turi pagal sritis nediferencijuotų žmogaus vaisiaus antinksčių ląstelių fiziologines savybes ir kurios ekspresuoja visus steroidogenezės reakcijų sekoje dalyvaujančius fermentus. Jų galima įsigyti iš ATCC.

Užšaldymo terpė – naudojama ląstelių užšaldymui ir užšaldytų ląstelių saugojimui. Tai – pradinė terpė, sumaišyta su priedu „BD Nu-serum“ ir dimetilsulfoksidu.

Tiesinės koreliacijos atkarpa – pagal hormonų matavimo sistemos duomenis sudarytos standartinės kreivės atkarpa, kurioje rezultatai proporcingi mėginyje esančios analitės koncentracijai.

LOQ – (angl. *Limit of Quantification*) kiekybinio nustatymo riba; tai – mažiausias cheminės medžiagos kiekis, kurį galima atskirti nuo nesamo cheminės medžiagos kiekio (tuščiosios vertės) neperžengiant nustatytos pasikliautinumo ribos. Šio metodo tikslais naudojamą LOQ, jeigu nenurodyta kitaip, paprastai nustato bandymo sistemų gamintojas.

LOEC – (angl. *Lowest Observed Effect Concentration*) mažiausia pastebėto poveikio koncentracija; tai – mažiausia koncentracija, kurią naudojant analizės metu pasireiškęs atsakas statistiškai skiriasi nuo nustatyto naudojant kontrolinį bandinį tirpiklį.

NOEC – (angl. *No Observed Effect Concentration*) nepastebėto poveikio koncentracija; tai – didžiausia išbandyta koncentracija, kuriai esant per analizę nenustatyta teigiamo atsako.

Pasažas – skaičius, reiškiantis, kiek kartų ląstelės pasidalijo nuo ląstelių išauginimo iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros. Pirminis iš užšaldytos pradinės ląstelių kultūros paimtos ląstelės pasažas žymimas vienetu (1). Vieną kartą pasidalijusios ląstelės ženklinamos kaip antro pasažo ląstelės ir t. t.

FBDT – *Dulbecco fosfatinis buferinis druskų tirpalas*.

Kokybės kontrolė – santrumpa KK; tai – priemonės, būtinos duomenų patikimumui užtikrinti.

Kokybės kontrolės plokštelė – 24 duobučių plokštelė, kurioje yra dviejų dydžių koncentracijos teigiamo ir neigiamo kontrolinių bandinių ir kuri naudojama naujos ląstelių grupės veiksmingumui stebėti arba kaip teigiama analizės kontrolė atliekant cheminių medžiagų bandymus.

Bandymo kartas – nepriklausomas eksperimentas, kurį atliekant naudojamas naujas tirpalų ir kontrolinių bandinių rinkinys.

Pradinė terpė – pagrindas kitiems reagentams ruošti. Ji sudaryta iš modifikuotos terpės „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM) ir maisto medžiagų mišinio „Ham's F-12“ (F12), santykiu 1:1 sumaišytų 15 mM buferinio tirpalo HEPES, be fenolio raudonojo ir natrio bikarbonato. Natrio bikarbonatas įmaišomas kaip buferinis tirpalas, žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlį.

Priedais papildyta terpė – tai pradinė terpė, sumaišyta su priedu „BD Nu-Serum“ ir mišiniu „ITS+ premium“, žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) II priedėlį.

Steroidogenezė – sintezės reakcijų seka, kurios metu cholesterolis virsta įvairiais steroidiniais hormonais. Keli steroidų sintezės reakcijų sekos tarpiniai junginiai, kaip antai progesteronas ir testosteronas, ne tik patys yra svarbūs hormonai, bet ir atlieka tolesniame sintezės reakcijų sekos etape atlieka susidarančių hormonų pirmtakų funkciją.

Testosteronas – vienas iš dviejų svarbiausių androgenų žinduolių sistemose.

Bandomoji cheminė medžiaga – bet kuri medžiaga ar mišinys, bandomas taikant šį bandymų metodą.

Bandomoji plokštelė – plokštelė, kurioje H295R ląstelės veikiamos bandomosiomis cheminėmis medžiagomis. Bandomojoje plokštelėje yra kontrolinio bandinio tirpiklio ir bandomosios cheminės medžiagos; naudojamos septynių dydžių koncentracijos cheminės medžiagos ir kiekvienos koncentracijos medžiaga bandoma trijose duobutėse.

Tripsinas 1X – praskiestas fermento tripsino (kasos serino proteazės) tirpalas, naudojamas siekiant atskirti ląsteles nuo ląstelių auginimo plokštelės, žr. tinkamumo patvirtinimo ataskaitos (4) III priedėlį.

B.58. GRAUŽIKŲ SOMATINIŲ IR EMBRIONINIŲ LĄSTELIŲ TARPGENINIŲ MUTACIJŲ ANALIZĖ

IVADAS

1. Šis bandymų metodas atitinka EBPO Bandymų gaires (angl. OECD Test Guideline (TG)) Nr. 488 (2013). Pagal esamus ES bandymų metodus galima atlikti daug įvairios *in vitro* mutacijų analizės, padedančios aptikti chromosomų ir (arba) genų mutacijas. Turima bandymų metodų, skirtų *in vivo* vertinamosioms baigtims (t. y. chromosomų aberacijoms ir nenumatytai DNR sintezei) tirti; tačiau per tuos bandymus genų mutacijos nėra vertinamos. Transgeninių graužikų (angl. TGR) mutacijų analize patenkinamas poreikis turėti praktišką ir plačiai prieinamą metodą *in vivo* bandymų genų mutacijoms vertinti.
2. Transgeninių graužikų mutacijų analizė buvo nuodugniai išnagrinėta (24) (33). Šioje analizėje naudojamos transgeninės žiurkės ir pelės, kurių chromosomose yra daug integruotų plazmidžių arba fagų universalių vektorių kopijų. Transgeninės ląstelės turi reporterinių genų, pagal kuriuos aptinkamos bandomųjų cheminių medžiagų *in vivo* sukeltos įvairaus pobūdžio mutacijos.
3. Graužiko organizme vykstančios mutacijos skaičiuojamos išskiriant transgeną ir analizuojant reporterinio geno neturinčios bakterijos nešiotijos reporterinio geno fenotipą. Atliekant transgeninių graužikų genų mutacijų analizę įvertinamos praktiškai iš bet kurio graužikų organų audinio išskirtų genetiškai neutralių genų mutacijos. Todėl atliekant šią analizę išvengiama daugelio esamų apribojimų, susijusių su *in vivo* endogeninių genų mutacijų tyrimais (pvz., ne visi audiniai tinka analizei, neigiama/teigiama mutacijų atranka).
4. Iš įrodomosios vertės analizės matyti, kad transgenai reaguoja į mutagenus panašiai kaip endogeniniai genai, ypač tais atvejais, kai vertinamos bazių porų pakaitos, skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos, nedidelės delecijos ir intarpai (24).
5. Per tarptautinius genotoksiškumo bandymų seminarus (angl. IWGT) patvirtinta, kad transgeninių graužikų genų mutacijų analizę galima taikyti *in vivo* genų mutacijoms nustatyti, ir rekomenduotas analizės įgyvendinimo protokolai (15) (29). Šis bandymų metodas parengtas pagal tas rekomendacijas. Išsamesnė analizė, kuria pagrindžiamas šio protokolo taikymas, pateikta (16).
6. Numatoma, kad ateityje transgeninių graužikų genų mutacijų analizę galbūt bus galima sujungti su kartotinių dozių toksikologinio tyrimu (šio priedo B.7 skyrius). Tačiau reikia surinkti duomenis, kuriais būtų patvirtinta, kad transgeninių graužikų genų mutacijų analizės jautrumas nepakis, jei laikotarpis nuo paskutinės dozės davimo iki mėginių paėmimo bus trumpesnis, t. y. viena diena, – toks laikotarpis yra taikomas per kartotinių dozių toksikologinį tyrimą, – o ne trys dienos, kaip atliekant transgeninių graužikų genų mutacijų analizę. Taip pat reikia surinkti duomenis, kuriais būtų parodyta, jog tai, kad naudojama transgeninė, o ne tradicinė graužikų veislė, neturės neigiamos įtakos kartotinių dozių analizei. Kai šie duomenys bus turimi, bandymų metodas bus atnaujintas.
7. Pagrindinių sąvokų apibrėžtys pateiktos priede.

PRADINIAI ASPEKTAI

8. Transgeninių graužikų genų mutacijų analizė, kurios taikymui pagal šį bandymų metodą pagrįsti yra turima pakankamai duomenų, yra: bakteriofago su *lacZ* genu analizė naudojant peles (Muta™Mouse analizė); *lacZ* geno plazmidės analizė naudojant peles; *gpt* delta (*gpt* ir *Spi*⁺) analizė naudojant peles ir žiurkes; *lacI* geno analizė naudojant peles ir žiurkes (Big Blue®), kai šio įvairaus pobūdžio analizė atliekama standartinėmis sąlygomis. Be to, mutacijoms įvertinti pagal Big Blue® ir Muta™Mouse modelius galima taikyti *cII* teigiamos atrankos analizę. Pagal transgeninių graužikų modelius mutagenezė paprastai yra vertinama skaičiuojant mutacijų dažnį; tačiau jeigu reikia, iš molekulinės mutacijų analizės galima gauti papildomos informacijos (žr. 24 punktą).
9. Šie graužikų *in vivo* genų mutacijų bandymai ypač tinka mutageniniam pavojui vertinti, nes analizės rezultatai priklauso nuo *in vivo* metabolizmo, farmakokinetikos, DNR pažaidų reparacijos ir apeinančios pažaidos DNR sintezės, nors šie rezultatai gali skirtis dėl gyvūnų rūšies, audinio ir DNR pažaidos pobūdžio. Genų mutacijų *in vivo* analizė yra naudinga, kai norima išsamiau ištirti *in vitro* sistema nustatytą mutageninį poveikį ir papildyti bandymų, per kuriuos naudotos kitos *in vivo* vertinamosios baigtys, rezultatus (24). Genų mutacija yra ne tik priežastiniais ryšiais susijusi su vėžiniais susirgimais – ji yra svarbi vertinamoji baigtis prognozuojant mutacijų sukeliamas nevėžines somatinių audinių ligas (12) (13) ir per embrioninių ląstelių liniją perduodamas ligas.

10. Kai turima duomenų, kad bandomoji cheminė medžiaga arba atitinkamas metabolitas nepasieks nė vieno iš reikiamų audinių, transgeninių graužikų genų mutacijų analizę atlikti nėra tikslinga.

BANDYMŲ METODO PRINCIPAS

11. Atliekant 8 punkte aptartą analizę tiriamasis genas – pagal kilmę bakterinis arba bakteriofaginis – iš graužiko genomo DNR yra išgaunamas transgeną įterpus į bakteriofago arba plazmidės universalų vektorių. Per šią procedūrą iš reikiamo graužiko audinio genomo DNR išskiriama, paruošiama *in vitro* (t. y. liambda vektorių pakavimas, plazmidžių ligacija ir elektroporacija universaliam vektoriui išgauti), paskui nustatomos bakterijose nešiotojose tam tikromis sąlygomis vykstančios mutacijos. Analizei naudojami neutralūs transgenai, kuriuos lengva išskirti iš daugumos audinių.
12. Per pagrindinį transgeninių graužikų genų mutacijų bandymą graužikui tam tikrą laiką duodama cheminė medžiaga. Cheminės medžiagos galima duoti bet kuriuo tam tinkamu būdu, taip pat ir implantuojant (pvz., kai bandyme naudojami medicininiai prietaisai). Visas laikotarpis, kuriuo gyvūnui duodamos dozės, vadinamas *medžiagos davimo laikotarpiu*. Pasibaigus medžiagos davimo laikotarpiui, iki gyvūnų numarinimo cheminė medžiaga paprastai nebeduodama, o neištaisytos DNR pažaidos fiksuojamos kaip stabilios mutacijos. Literatūros šaltiniuose šis laikotarpis vadinamas įvairiai: pasireiškimo, fiksavimo arba ekspresijos laikotarpiu; šio laikotarpio pabaiga yra *mėginių ėmimo laikas* (15) (29). Gyvūną numarinus genomo DNR yra izoliuojama iš reikiamo (-ų) audinio (-ių) ir išgryninama.
13. Vieno gyvūno audinio duomenys, gauti iš kelių pakavimo/ligacijos operacijų, dažniausiai yra sumuojami, mutacijų dažnis paprastai įvertinamas imant 10^5 – 10^7 plokšteles arba kolonijas sudarančių vienetų. Kai taikomi teigiamos atrankos metodai, bendras plokšteles sudarančių vienetų skaičius yra nustatomas naudojant atskirą neselektyvių lėkštelių rinkinį.
14. Teigiami atrankos metodai buvo sukurti tam, kad būtų lengviau surasti *gpt* geno mutacijas [*gpt delta* analizė naudojant peles ir žiurkes, *gpt* – fenotipo analizė (20) (22) (28)] ir *lacZ* geno analizė [Muta™Mouse arba *lacZ* plazmidžių analizė naudojant peles (3) (10) (11) (30)]; *lacI* genų mutacijos Big Blue® gyvūnų organizmuose nustatomos naudojant neselektyvų metodą, kuriuo mutacijos nustatomos pagal spalvotų (mėlynų) plokštelių susidarymą. Yra ir teigiamos atrankos metodų, kuriuos galima taikyti bakteriofago universalus vektoriaus *cII* geno taškinėms mutacijoms nustatyti [analizė, kai naudojamos Big Blue® pelės arba žiurkės, ir Muta™Mouse analizė (17)] ir *λ red* ir *gam* genų delecijos mutacijoms nustatyti [Spi – atrankos analizė naudojant *gpt delta* peles ir žiurkes (21) (22) (28)]. *Mutacijų dažnis* apskaičiuojamas plokštelių/plazmidžių, kuriose yra transgeno mutacijų, skaičių padalijus iš bendro plokštelių/plazmidžių, išskirtų iš to paties DNR mėginio, skaičiaus. TGR genų mutacijų tyrimuose mutacijų dažnis yra vienas iš ataskaitoje nurodomų parametrų. Be to, *mutacijų dažnis* gali būti apskaičiuojamas kaip ląstelių, nešančių *nepriklausomas* mutacijas, dalis; šio skaičiavimo rezultatus reikia koreguoti pagal kloninę ekspansiją, kuri įvertinama pagal išskirtų mutacijų seką (24).
15. Mutacijas, skaičiuojamas atliekant *lacI*, *lacZ*, *cII* ir *gpt* taškinių mutacijų analizę, pirmiausia sudaro bazių porų pakaitos, skaitymo rėmelio poslinkio mutacijos ir nedideli intarpai/delecijos. Santykinė šių tipų mutacijų dalis, palyginti su savaiminėmis mutacijomis, yra panaši į endogeninio *Hprt* geno. Didelių delecijų nustatoma tik atliekant Spi – atrankos ir *lacZ* plazmidžių analizę (24). Tiriamos mutacijos – pelėms arba žiurkėms *in vivo* pasireiškiančios mutacijos. *In vitro* ir *ex vivo* mutacijos, kurios gali kilti per fagų/plazmidžių išgavos, sintezės arba pažaidų reparacinius procesus, yra santykinai retos ir kai kuriose sistemose gali būti specialiai pažymimos arba atmetamos taikant bakterijos nešiotojos/teigiamos atrankos sistemą.

METODO APRAŠYMAS

Paruošiamieji darbai

Gyvūnų rūšies parinkimas

16. Šiuo metu galima taikyti įvairius transgeninių pelių genų mutacijos nustatymo modelius, šios sistemos naudojamos plačiau negu transgeninių žiurkių modeliai. Jeigu žiurkių modelis yra akivaizdžiai tinkamesnis negu pelių (pvz., kai tiriamas tik žiurkėms nustatomų auglių karcinogenezės mechanizmas ir šis tyrimas derinamas su toksikologinio žiurkėms tyrimu arba jeigu yra žinoma, kad žiurkių metabolizmas geriau atspindi žmonių metabolizmą), reikėtų apsvarstyti galimybę naudoti transgeninių žiurkių modelius.

Laikymo ir šėrimo sąlygos

17. Bandomųjų gyvūnų patalpos temperatūra turi būti 22 °C ($\pm$ 3 °C). Nors santykinė drėgmė turėtų būti mažiausiai 30 % ir pageidautina ne didesnė kaip 70 %, išskyrus patalpos plovimo laiką, reikėtų siekti, kad santykinė oro drėgmė būtų 50–60 %. Apšvietimas turėtų būti dirbtinis – pakaitomis 12 h šviesos ir 12 h tamsos per parą. Gyvūnams šerti tinka įprastas laboratorijoje naudojamas pašaras, o geriamojo vandens kiekis neribojamas. Jei bandomoji medžiaga duodama su pašarais, juos renkantis turi būti užtikrinama, kad bandomąją medžiagą būtų galima tinkamai su jais sumaišyti. Gyvūnai turėtų būti laikomi mažomis grupėmis (ne daugiau kaip po penkis) tos pačios lyties gyvūnus, jeigu nėra agresyvaus elgesio pavojaus. Moksliskai pagrįstais atvejais gyvūnus galima laikyti atskirai.

Gyvūnų paruošimas

18. Sveiki jauni lytiškai subrendę gyvūnai (kurių amžius pradedant duoti cheminę medžiagą yra 8–12 savaičių) atsitiktine tvarka suskirstomi į kontrolinę ir dozes gaunančią grupes. Kiekvienas gyvūnas paženklintas unikalia žyma. Gyvūnams leidžiama aklimatizuotis prie laboratorinių sąlygų mažiausiai 5 dienas. Narveliai išdėstomi taip, kad būtų kiek įmanoma sumažintas bet koks galimas poveikis dėl narvelio vietos. Bandymo pradžioje gyvūnų svorio variacija turi būti kuo mažesnė; jų svoris turi būti ne didesnis kaip $\pm$ 20 % atitinkamos lyties gyvūnų vidutinio svorio.

Dozių ruošimas

19. Kietosios bandomosios cheminės medžiagos prieš duodant gyvūnams turėtų būti ištirpinamos atitinkamuose tirpikliuose ar nešikliuose arba turėtų būti paruošta jų suspensija, prireikus jos įmaišomos į pašarą arba geriamąjį vandenį. Skystos bandomosios cheminės medžiagos gali būti duodamos iš karto arba prieš tai praskiestos. Jeigu bandomoji cheminė medžiaga duodama per kvėpavimo takus, ją galima duoti dujų, garų arba kieto/skysto aerozolio pavidalu atsižvelgiant į tai, kokios yra jos fizikinės ir cheminės savybės. Naudojami švieži bandomosios cheminės medžiagos preparatai, nebent duomenys apie medžiagos stabilumą rodo, kad ją galima laikyti.

Bandymo sąlygos*Tirpiklis/nešiklis*

20. Naudojamos tirpiklio ar nešiklio dozės neturėtų kelti jokio toksinio poveikio ir neturėtų kilti spėlionių, kad jis gali chemiškai reaguoti su bandomąja chemine medžiaga. Jeigu naudojami kiti mažiau žinomi tirpikliai/nešikliai, prieš pradedant juos naudoti reikia pateikti jų tinkamumą įrodančius duomenis. Jeigu yra įmanoma, pirmiausia rekomenduojama naudoti vandeninį tirpiklį arba nešiklį.

Teigiamos kontrolės grupės

21. Paprastai reikėtų naudoti lygiagrečios teigiamos kontrolės grupių gyvūnus. Tačiau kiekviena laboratorija, kuri yra įrodžiusi savo kompetenciją (žr. 23 punktą) ir kuri šią analizę atlieka nuolat, metodo sėkmingumui patvirtinti gali į kiekvieną bandymą įtraukti ankstesnių bandymų teigiamos kontrolės gyvūnų DNR. Per ankstesnius bandymus paimtos DNR turėtų būti tų pačių rūšių gyvūnų ir audinių ir tinkamai laikomos (žr. 36 punktą). Kai naudojamos lygiagrečios teigiamos kontrolės grupės, dozės joms nėra būtina duoti tuo pačiu būdu, koku yra duodama bandomoji cheminė medžiaga; tačiau turėtų būti įrodyta, kad viename arba keliuose reikiamuose teigiamos kontrolės grupės gyvūnų audiniuose dėl bandomosios cheminės medžiagos vyksta mutacijos. Teigiamos kontrolės grupei duodamos cheminės medžiagos dozės turėtų būti pasirenkamos tokios, kad sukeltų silpną arba vidutinį poveikį, pagal kurį būtų galima kritiškai vertinti analizės rezultatyvumą ir jautrumą. Teigiamos kontrolės cheminių medžiagų pavyzdžiai ir kai kurie jų veikiami audiniai yra išvardyti 1 lentelėje.

1 lentelė

Teigiamos kontrolės cheminių medžiagų pavyzdžiai ir kai kurie jų veikiami audiniai

Teigiamos kontrolės cheminė medžiaga ir CAS Nr.	Einecs pavadinimas ir Einecs Nr.	Apibūdinimas	Mutacijos tikslinis organas	
			Žiurkių	Pelių
N-etil-N-nitrozošlapalas [CAS Nr. 759–73–9]	N-etil-N-nitrošlapalas [212–072–2]	Tiesiogiai veikiantis mutagenas	Kepenys, plaučiai	Kaulų čiulpai, gaubtinė žarna, gaubtinės žarnos epitelis, plonoji žarna, kepenys, plaučiai, blužnis, inkstai, kiaušidžių granuliozinės ląstelės, patinėlių embrioninės ląstelės

Teigiamos kontrolės cheminė medžiaga ir CAS Nr.	Einecs pavadinimas ir Einecs Nr.	Apibūdinimas	Mutacijos tikslinis organas	
			Žiurkių	Pelių
Etilkarbamatas (uretanai) [CAS Nr. 51–79–6]	Uretanas [200–123–1]	Mutagenas, reikalingas metabolizmas, bet pasireiškia tik silpnas poveikis		Kaulų čiulpai, prieškrandis, plonoji žarna, kepenys, plaučiai, blužnis
2,4-Diaminotoluenas [CAS Nr. 95–80–7]	4-metil-m-fenilenediaminas [202–453–1]	Mutagenas, reikalingas metabolizmas, teigiamas atliekant Spi analizę	Kepenys	Kepenys
Benzo[a]pirenas [CAS Nr. 50–32–8]	Benzo[def]chrizenas [200–028–5]	Mutagenas, reikalingas metabolizmas	Kepenys, taukinė	Kaulų čiulpai, krūtys, gaubtinė žarna, prieškrandis, liaukinė skrandžio dalis, širdis, kepenys, plaučiai, patinėlių embrioninės ląstelės

Neigiamos kontrolės grupės

22. Kiekvieną kartą į imamus mėginius reikėtų įtraukti neigiamos kontrolės grupių, kurioms buvo duodamas tik tirpiklis arba tik nešiklis ir kurios visais kitais aspektais buvo laikomos tomis pačiomis sąlygomis kaip dozės gavusios grupės, mėginius. Jeigu neturima anksčiau surinktų arba nėra anksčiau paskelbtų kontrolinių duomenų, iš kurių būtų matyti, kad pasirinktas tirpiklis/nešiklis nesukelia delecijų arba nedaro mutageninio poveikio, kiekvieną kartą į imamus mėginius reikėtų įtraukti ir kontrolinių grupių, kurioms medžiagos neduota, mėginius, taip siekiant nustatyti, ar nešiklio kontrolinės grupės mėginiai yra tinkami.

Laboratorijos kompetencijos patikrinimas

23. Kompetenciją atlikti šią analizę reikėtų patikrinti įrodant, kad pagal paskelbtus duomenis gebama atkartoti šiuos numatytus rezultatus (24): 1) mutacijų dažnio naudojant teigiamas kontrolines chemines medžiagas (įskaitant silpną atsaką), pavyzdžiui, išvardytas 1 lentelėje, nemutagenus ir kontrolinius nešiklius; ir 2) transgenų išgavos iš genomo DNR (pvz., pakavimo efektyvumo).

Mutacijų sekos nustatymas

24. Reguliavimo tikslais nereikalaujama nustatyti mutacijų DNR sekos, ypač kai gaunami aiškūs teigiami arba neigiami rezultatai. Tačiau nustatytos sekos duomenys gali būti naudingi, kai pastebima atskirų atvejų skirtumų. Tuomet seka gali būti nustatoma tam, kad būtų galima atmesti mutacijų banko (angl. *jackpot*) arba klonavimosi tikimybę, – nustatoma unikalių mutacijų konkrečiame audinyje dalis. Norint nustatyti, ar kloninės mutacijos prisidėjo prie mutacijų dažnio, dažniausiai pakanka nustatyti maždaug 10 mutacijų viename vieno gyvūnų audinyje seką; norint matematiškai pakoreguoti mutacijų dažnį, atsižvelgiant į kloniškumą gali prireikti nustatyti bent 25 mutacijų sekas. Galimybė nustatyti mutacijų seką svarstytina ir tada, kai pastebimas šio toks mutacijų dažnio padidėjimas (t. y. nedaug viršijantis kontrolinių grupių, kurioms medžiagos neduodama, vertes). Mutacijų spektro skirtumai tarp mutuojančių kolonijų palyginus gyvūnus, kuriems medžiagos duodama, ir gyvūnus, kuriems medžiagos neduodama, gali padėti patvirtinti mutageninį poveikį (29). Mutacijų spektras taip pat gali būti naudingas plėtojant mechanistines hipotezes. Jeigu sekos nustatymą ketinama įtraukti į tyrimo protokolą, reikėtų ypač atkreipti dėmesį į tokių tyrimų struktūrą, ypač į vieno mėginio mutacijų sekų skaičių, tam, kad pagal taikomą statistinį modelį būtų užtikrinta pakankama statistinė galia (žr. 43 punktą).

BANDYMO PROCEDŪRA

Gyvūnų skaičius ir lytis

25. Gyvūnų skaičius vienoje grupėje nustatomas iš anksto ir turėtų būti toks, kad gyvūnų pakaktų statistinei galiai užtikrinti ir kad būtų galima nustatyti bent mutacijų dažnio dvigubėjimą. Grupę turi sudaryti ne mažiau kaip penki gyvūnai; tačiau jeigu statistinė galia nepakankama, gyvūnų skaičių reikėtų didinti tiek, kiek reikia. Paprastai naudojami patinėliai. Tam tikrais atvejais būna pagrindo bandymus daryti tik su patelėmis; pavyzdžiui, kai bandomi konkrečiai moterims skirti vaistai arba kai tiriamas moterims būdingas metabolizmas. Jeigu tarp lyčių yra didelių toksiškumo arba metabolizmo skirtumų, reikia naudoti ir patinėlius, ir pateles.

Dozių davimo laikotarpis

26. Kadangi pastebėta, jog mutacijos didėja su kiekviena doze, dozes reikia kartoti, duoti kasdien 28 dienas. Paprastai manoma, kad toks laikotarpis yra pakankamas ir tam, kad silpni mutagenai sukeltų pakankamai mutacijų, ir tam, kad veikimo laiko pakaktų nustatyti mutacijoms organuose, kurių ląstelės lėtai proliferuoja. Kai kuriems vertinimams atlikti gali būti tikslinga taikyti kitokį dozavimo režimą; alternatyvūs dozavimo režimai turėtų būti mokslškai pagrįsti protokole. Dozės neturėtų būti duodamos trumpiau, negu reikia visiems atitinkamiems metabolizuojantiems fermentams iki galo sužadinti; jeigu dozės duodamos trumpiau, gali tekti paskirti kelis mėginių surinkimo laiko momentus, tinkamus organams, kurių ląstelių proliferacijos tempas yra skirtingas. Bet kuriuo atveju protokolui pagrįsti reikėtų remtis visa turima informacija (pvz., apie bendrąjį toksiškumą arba metabolizmą, farmakokinetiką), ypač tada, kai nukrypstama nuo pirmiau išdėstytų standartinių rekomendacijų. Nors esant ilgesniam negu 8 savaičių dozių davimo laikotarpiui ir būtų lengiau pasiekti didesnę jautrumą, tai reikėtų tiksliai paaiškinti ir pagrįsti, nes dozes duodant ilgiau, mutacijų dažnumas gali akivaizdžiai padidėti dėl kloninės ekspansijos (29).

Dozės dydžiai

27. Dozių dydis turėtų būti pagrįstas dozės dydžio intervalo nustatymo tyrimo, kuriuo vertintas bendrasis toksiškumas ir per kurį buvo taikytas tas pats medžiagos davimo būdas, rezultatais arba ankstesniais poūmio toksiškumo bandymų rezultatais. Tos pačios graužikų veislės netransgeniniai gyvūnai gali būti naudojami dozės dydžio intervalui nustatyti. Atliekant pagrindinį bandymą ir norint surinkti informaciją apie atsaką į dozes, iš viso per tyrimą reikėtų naudoti neigiamos kontrolės grupę (žr. 22 punktą), ne mažiau kaip trijų dydžių, kurie skiriasi tinkamais intervalais, dozes, išskyrus tuos atvejus, kai naudojama ribinė dozė (žr. 28 punktą). Didžiausia dozė turėtų būti maksimali toleruojama dozė (MTD). MTD laikoma dozė, kuri sukelia tokius toksiškumo požymius, kad pagal tą pačią seką duodama didesnė dozė būtų mirtina. Cheminėms medžiagoms, pasižyminčioms specifiniu biologiniu aktyvumu, kai jų dozės būna mažos ir netoksiškos (pavyzdžiui, hormonams ir mitogenams), ir cheminėms medžiagoms, kurioms būdinga toksikokinetinių savybių saturacija, gali būti taikoma dozės dydžio nustatymo kriterijų išimtis; šias chemines medžiagas reikėtų vertinti kiekvienu atveju atskirai. Naudojamų dozių dydis turėtų apimti intervalą nuo maksimalios dozės iki tokios, kuri yra labai mažai toksiška arba visai netoksiška.

Ribinis bandymas

28. Jeigu iš duomenų, gautų per dozės dydžio intervalo nustatymo bandymus arba bandymus su giminingomis graužikų veislėmis, matyti, kad tais atvejais, kai duodama dozė yra ne mažesnė už ribinę (žr. toliau), jokio pastebimo toksinio poveikio nebūna, ir, remiantis struktūriškai panašių cheminių medžiagų bandymų duomenimis, manoma, kad medžiaga neturėtų būti genotoksiška, išsamus bandymas su trijų dydžių dozėmis gali būti nebūtinas. Kai dozių davimo laikotarpis yra 28 dienas (t. y. dozės duodamos kasdien 28 dienas), ribinė dozė yra 1 000 mg/kg kūno masės per dieną. Jeigu dozė duodama 14 dienų arba trumpiau, ribinė dozė yra 2 000 mg/kg kūno masės per dieną (jeigu dozių davimo grafikas yra kitoks, dozės duodamos ne 28 dienas kasdien, tai protokole reikėtų mokslškai pagrįsti, žr. 26 punktą).

Dozių davimas

29. Bandomoji cheminė medžiaga paprastai būna duodama per zondą, naudojant skrandžio zondą arba tinkamą intubacinį vamzdelį. Apskritai rengiantis atlikti analizę reikėtų atsižvelgti į numatomą žmogaus sąlyčio su medžiaga būdą. Todėl kitus sąlyčio su medžiaga būdus (su geriamuoju vandeniu, poodinėmis, intraveninėmis injekcijomis, uždėjus ant odos, per kvėpavimo takus, lašinant į trachėją, su pašaru, implantuojant) galima taikyti, kai juos galima pagrįsti. Injekcijos į pilvą nerekomenduojamos, nes fiziologiškai šis būdas nėra artimas žmogaus sąveikos su medžiaga būdai. Maksimalus skysčio, kurį galima duoti per zondą arba sušvirkšti per vieną kartą, tūris priklauso nuo bandomojo gyvūno dydžio. Šis tūris neturėtų būti didesnis kaip 2 ml/100g kūno masės. Didensnio nei šis tūrio naudojimą reikėtų pagrįsti. Išskyrus dirginančias ar esdinančias medžiagas, kurių didesnės koncentracijos paprastai sukelia sunkesnę poveikį, bandomojo tūrio svyravimai turi būti kuo mažesni: koncentracija pakoreguojama taip, kad visų dozių tūris būtų toks pats.

Mėginių ėmimo laikas*Somatinės ląstelės*

30. Mėginių ėmimo laikas yra svarbus veiksnys, nes jį nulemia mutacijoms pasireikšti reikalingas laikotarpis. Šis laikotarpis priklauso nuo audinio ir yra susijęs su ląstelių populiacijos dalijimosi ciklo trukme: kaulų čiulpų ir plonosios žarnos atsakas būna greitas, kepenų – lėtesnis. Tinkamas kompromisas mutacijų dažniui matuoti ir tuose

audiniuose, kurių ląstelių proliferacija yra sparti, ir tuose, kurių ląstelių proliferacija yra lėta, – dozes duoti 28 dienas iš eilės (kaip nurodyta 26 punkte), o mėginius imti praėjus trimis dienoms po paskutinės dozės davimo; vis dėlto audiniuose, kurių ląstelių proliferacija yra lėta, didžiausias mutacijų dažnis šiomis sąlygomis dar gali būti nepasiektas. Jeigu audiniai, kurių ląstelių proliferacija yra lėta, yra ypač svarbūs, tada mėginius gali būti tikslinga paimti vėliau, po 28 dienų nuo 28 dienų dozių davimo laikotarpio pabaigos (16) (29). Tokiais atvejais mėginiai imami vėliau, ne po 3 dienų; tai reikėtų mokslškai pagrįsti.

Embrioninės ląstelės

31. Transgeninių graužikų analizė labai tinka patinėlių embrioninėse ląstelėse (7) (8) (27) sukeltoms genų mutacijoms tirti, nes spermatogenezės laikas ir kinetika yra tiksliai apibrėžta (27). Kadangi kiaušinėlių, kuriuos būtų galima analizuoti, skaičius būna nedidelis, net ir įvykus superovuliacijai, ir kadangi oocituose DNR sintezė nevyksta, mutacijų patelių embrioninėse ląstelėse transgenine analize nustatyti negalima (31).
32. Patinėlių embrioninių ląstelių mėginių paėmimo laiką reikėtų pasirinkti taip, kad į mėginį patektų įvairios įvairiais vystymosi etapais paveiktos embrioninės ląstelės ir kad tuo etapu, kada imamas mėginys, embrioninės ląstelės būtų pakankamai paveiktos. Pelių embrioninių ląstelių vystymosi nuo spermatogoninių kamieninių ląstelių iki subrendusių spermatozoidų, kurie pasiekia sėklinį lataką/antsėklidžio uodegą, laikotarpis trunka apie 49 dienas (36), žiurkių – apie 70 dienų (34) (35). Jeigu dozės duodamos 28 dienas, o paskui po trijų dienų paimami mėginiai, mėginių, paimtų iš sėkliniame latakė/antsėklidžio uodegoje susikaupusios spermos (7) (8), ląstelės bus buvusios veikiamos apytiksliai vėlesniu oja spermatogenezės laikotarpiu, kuris apima mejozinį ir pomejozinį etapus, bet neapima spermatogonijų arba kamieninių ląstelių etapo. Norint tinkamai paimti ląstelių, kurios sąlyčio su medžiaga laikotarpiu buvo spermatogoninės kamieninės ląstelės, mėginius iš sėklinio latakė/antsėklidžio uodegos, reikia mėginius imti vėliau, praėjus ne mažiau kaip 7 savaitėms (kai naudojamos pelės) arba 10 savaičių (kai naudojamos žiurkės) nuo dozių davimo laikotarpio pabaigos.
33. Ląsteles, paimtas iš sėklinių kanalėlių laikantis 28 + 3 dienų režimo, sudaro mišri populiacija, atspindinti visus embrioninių ląstelių vystymosi etapus (7) (8). Vertinant genų mutacijoms nustatyti paimtus šių ląstelių mėginius gauti duomenys apie etapus, kuriais sukeliamos embrioninių ląstelių mutacijos, bus ne tokie tikslūs kaip tuo atveju, kai spermatozoidų mėginiai paimami iš sėklinio latakė/antsėklidžio uodegos (nes iš kanalėlių paimtuose mėginiuose yra įvairaus pobūdžio embrioninių ląstelių, į šią ląstelių populiaciją patenka kai kurios somatinės ląstelės). Tačiau jeigu ląstelių mėginiai paimami ne tik iš sėkliniame kanale/antsėklidžio uodegoje esančių spermatozoidų, bet ir iš sėklinių latakėlių, laikantis tik 28 + 3 dienų mėginių ėmimo režimo, yra paimama ląstelių, kurios buvo veikiamos visais pagrindiniais embrioninės ląstelės vystymosi etapais, ir tokie mėginiai gali būti naudingi kai kuriems embrioninių ląstelių mutagenams nustatyti.

Stebėjimai

34. Bendrus klininius stebėjimus reikia atlikti mažiausiai kartą per dieną, geriausiai tuo pačiu dienos metu, atsižvelgiant į numatomų poveikių piką. Gyvūnų sveikatos būklę reikia registruoti. Mažiausiai du kartus per dieną visi gyvūnai turėtų būti patikrinami – ar negaišta, ar nenugaiše. Visi gyvūnai turėtų būti sveriami bent kartą per savaitę ir numarinant. Suvartojamo pašaro kiekis turi būti matuojamas bent kas savaitę. Jeigu bandomoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu, suvartoto vandens kiekį reikėtų išmatuoti kaskart, kai vanduo keičiamas, ir bent kartą per savaitę. Gyvūnus, kuriems pasireiškia nemirtini pernelyg didelio toksiškumo požymiai, reikėtų numarinti iki bandymo pabaigos (23).

Audinių surinkimas

35. Audinių surinkimą reikėtų aiškiai apibrėžti. Kadangi galima tirti praktiškai bet kuriame audinyje sukeltas mutacijas, audinius, kurie bus surenkami, reikėtų pasirinkti remiantis tyrimo paskirtimi ir visais turimais tiriamos cheminės medžiagos mutageniškumo, karcinogeniškumo arba toksiškumo duomenimis. Svarbūs veiksniai, į kuriuos reikėtų atsižvelgti, – tai davimo būdas (pagal tai, koks (-ie) yra tikėtinas (-i) žmogaus sąlyčio su medžiaga būdas (-ai)), numatomas pasiskirstymas audinyje, galimas veikimo mechanizmas. Jeigu bendros informacijos nėra, reikėtų surinkti kelis galinčius būti svarbius somatinius audinius. Tarp jų turėtų būti greitos ląstelių proliferacijos, lėtos ląstelių proliferacijos audiniai ir audiniai iš sąlyčio vietos. Taip pat reikėtų paimti spermatozoidų iš sėklinio latakė/antsėklidžio uodegos, besivystančių embrioninių ląstelių iš sėklinių kanalėlių (kaip paaiškinta 32 ir 33 punktuose) ir saugoti tam atvejui, jeigu ateityje prireiktų atlikti embrioninių ląstelių mutageniškumo analizę. Organus reikėtų pasverti; jei organai didesni, iš visų gyvūnų reikėtų surinkti vienodą jų plotą.

Audinių ir DNR saugojimas

36. Audinius (arba audinių homogenatus) reikėtų saugoti – 70 °C arba žemesnėje temperatūroje ir panaudoti DNR izoliavimui per 5 metus. Izoliuotą DNR, kuri saugoma sušaldyta 4 °C atitinkamoje buferinėje medžiagoje, mutacijų analizei geriausia panaudoti per vienus metus.

Audinių atranka mutacijų analizei atlikti

37. Audinius reikėtų pasirinkti pagal šiuos kriterijus: 1) tai, kaip dozės duodamos arba kurioje vietoje įvyksta pirmasis sąlytis (pvz., liaukinė skrandžio dalis, jeigu dozės duodamos per virškinamąjį traktą, plaučiai, jeigu dozės duodamos per kvėpavimo takus, arba oda, jeigu dozės dedamos ant kurios nors odos vietos); 2) bendrojo toksiškumo tyrimuose pastebimus farmakokinetinius parametrus, iš kurių matyti, kaip medžiaga pasiskirsto, išlieka arba kaupiasi audiniuose arba kuriuos audinius veikia toksiškai. Jeigu tyrimai atliekami karcinogeniškumo tyrimams papildyti, reikėtų atkreipti dėmesį į audinius, kuriems daromas karcinogeninis poveikis. Audinius analizei reikėtų pasirinkti taip, kad būtų galima kuo tiksliau aptikti chemines medžiagas, kurios tiesiogiai veikia kaip *in vitro* mutagenai, yra greitai metabolizuojamos, labai reaktyvios arba sunkiai absorbuojamos, arba chemines medžiagas, kurias duodant tikslinis audinys nustatomas pagal jos davimo būdą (6).
38. Jeigu anksčiau surinktos informacijos neturima, tada, atsižvelgiant į sąlyčio vietą pagal dozių davimo būdą, mutageniškumą reikėtų įvertinti bent kepenimis ir bent vienam audiniui, kurio ląstelės sparčiai dalijasi (pvz., liaukinė skrandžio dalį, kaulų čiulpus). Dauguma atvejų pirmiau išdėstytus reikalavimus galima įvykdyti analizuojant du kruopščiai atrinktus audinius, bet kai kuriais atvejais reikės analizuoti tris arba daugiau audinių. Jeigu yra pagrindo nerimauti konkrečiai dėl poveikio embrioninėms ląstelėms, taip pat ir dėl teigiamo somatinių ląstelių atsako, reikėtų įvertinti, ar embrioninių ląstelių audiniuose nevyksta mutacijų.

Matavimo metodai

39. Standartinius laboratorinius arba paskelbtus mutacijų nustatymo metodus galima taikyti, kai vykdoma šių modelių transgeninė analizė: *lacZ* lambda bakteriofagų ir plazmidžių (30); *lacI* pelių (2) (18); *gpt* delta pelių (22); *gpt* delta žiurkių (28); *dII* (17). Pakeitimus reikėtų pagrįsti ir tinkamai aprašyti. Kelių pakavimų duomenis galima sumuoti ir panaudoti reikiamam plokštelių arba kolonijų skaičiui gauti. Tačiau tai, kad reikia didesnio pakavimo reakcijų skaičiaus, kad būtų gautas reikiamas plokštelių skaičius, gali būti netinkamos DNR kokybės požymis. Tokiais atvejais duomenis reikėtų vertinti atsargiai, nes jie gali būti nepatikimi. Optimalus plokštelių arba kolonijų skaičius viename DNR mėginyje priklauso nuo statistinės pakankamo mutacijų skaičiaus aptikimo tikimybės esant pasirinktam savaiminių mutacijų dažniui. Bendrais atvejais, kai savaiminių mutacijų dažnis yra apie 3×10^{-5} , reikia ne mažiau kaip 125 000–300 000 plokštelių (15). Kai atliekama Big Blue® *lacI* analizė, svarbu parodyti, kad, lygia-grečiai į kiekvieną lėkštelę įterpus atitinkamas spalvų kontrolines priemones, galima nustatyti visų fenotipų spalvų mutacijas. Audinius ir iš jų paimitus mėginius (duomenis) reikėtų apdoroti ir analizuoti bloko principu, pagal kurį nešiklio/kontrolinės grupės, teigiamos kontrolės grupės (jei ji naudojama) arba teigiamos kontrolės DNR (jei naudojama) ir kiekvienos bandomosios grupės duomenys būtų apdorojami kartu.

DUOMENYS IR ATASKAITA

Rezultatų apdorojimas

40. Kiekvieno gyvūno bandymų rezultatai turėtų būti pateikiami lentelėse. Gyvūnas yra eksperimentinis vienetas. Ataskaitoje reikėtų nurodyti bendrą ląstelių plokšteles sudarančių vienetų (angl. pfu) arba kolonijas sudarančių vienetų (angl. cfu) skaičių, mutacijų skaičių, kiekvieno gyvūno kiekvieno audinio mutacijų dažnį. Jeigu vyksta kelios pakavimo/išlaisvinimo reakcijos, reikėtų nurodyti vienam DNR mėginiui tenkančių reakcijų skaičių. Reikėtų saugoti kiekvienos reakcijos duomenis, bet ataskaitoje nurodyti tik bendrą pfu arba cfu skaičių. Reikėtų nurodyti 34 punkte paaiškintus toksiškumo duomenis ir klinikinius požymius. Reikėtų nurodyti kiekvienos analizuotos mutacijos sekos nustatymo rezultatus, apskaičiuotą kiekvieno gyvūno ir audinio mutacijų dažnį.

Statistinis rezultatų įvertinimas ir aiškinimas

41. Teigiamą rezultatą galima nustatyti pagal keletą kriterijų, pavyzdžiui, nuo dozės dydžio priklausomų mutacijų dažnio padidėjimą arba akivaizdų mutacijų dažnio padidėjimą, gyvūnams gavus pavienę dozę ir paėmus vieną mėginį, palyginti su tirpiklio/nešiklio kontroline grupe. Norint gauti pakankamai duomenų dozės ir atsako tarpusavio ryšiui įvertinti, reikėtų analizuoti bent tris bandomąsias dozės grupes. Nors pirmiausia reikia siekti, kad rezultatai būtų biologiškai aktualūs, bandymo rezultatams įvertinti kaip pagalbinę priemonę galima taikyti atitinkamus statistinius metodus (4) (14) (15) (25) (26). Pagal taikomus statistinius testus eksperimentiniu vienetu turėtų būti laikomas gyvūnas.

42. Jei tiriant bandomąją cheminę medžiagą gaunami rezultatai, neatitinkantys pirmiau paminėtų kurio nors audinio kriterijų, medžiaga pagal šią analizę laikoma nemutageniška. Kad neigiamas rezultatas būtų biologiškai priimtinas, audinio sąlytį su medžiaga reikėtų patvirtinti.
43. DNR sekai analizuoti galima taikyti įvairius rezultatus aiškinti padedančius statistinius metodus (1) (5) (9) (19).
44. Patikrinus duomenis apie tai, ar stebimos vertės patenka į anksčiau nustatytą kontrolinį intervalą, galima gauti papildomos informacijos atsako biologiniam reikšmingumui įvertinti (32).

Bandymo ataskaita

45. Bandymo ataskaitoje turėtų būti ši informacija:

Bandomoji cheminė medžiaga:

- tapatumo duomenys ir CAS Nr., jei žinomas;
- šaltinis, partijos numeris, jei yra;
- fizikinė būsena ir grynumas;
- atliekamam bandymui svarbios fizikinės ir cheminės savybės;
- bandomosios cheminės medžiagos stabilumas, jei žinomas.

Tirpiklis/nešiklis:

- priežastys, dėl kurių buvo pasirinktas šis nešiklis;
- bandomosios cheminės medžiagos, esančios tirpiklyje/nešiklyje, tirpumas ir stabilumas, jei yra žinomas;
- preparatų su pašarais, geriamuoju vandeniu arba inhaliacinių preparatų ruošimas;
- analitiniai preparatų determinantai (pvz., stabilumas, vienalytiškumas, nominalioji koncentracija).

Bandomieji gyvūnai:

- rūšis/veislė ir jų pasirinkimo pagrindimas;
- gyvūnų skaičius, amžius ir lytis;
- šaltinis, laikymo sąlygos, pašaras ir kt.;
- kiekvieno gyvūno svoris prieš pradedant bandymą ir kiekvienos grupės svorio intervalas, vidurkiai bei standartinis nuokrypis.

Bandymo sąlygos:

- teigiamos ir neigiamos (tirpiklis/nešiklis) kontrolės duomenys;
- dozės dydžio intervalo nustatymo bandymo duomenys;
- pagrindinė priežastis, nulėmusi dozės dydžio pasirinkimą;
- duomenys apie bandomosios medžiagos paruošimą;
- išsamūs duomenys apie bandomosios cheminės medžiagos davimo būdą;
- pagrindinė priežastis, nulėmusi davimo būdo pasirinkimą;
- toksiškumo gyvūnams matavimo metodai, įskaitant, jei galima, histopatologinę arba hematologinę analizę, tai, kaip dažnai gyvūnai buvo stebimi ir buvo matuojama jų kūno masė;
- metodai, kuriais patvirtinama, kad bandomoji cheminė medžiaga pateko į veikiamą organą arba bendrąją apytaką, jei gauti neigiami rezultatai;
- bandomosios cheminės medžiagos koncentracijos pašaruose ir (arba) geriamajame vandenyje (ppm) perskaičiavimas į tikrąją dozę (mg/kg kūno masės per parą) ir suvartojimas, jei tinka;
- išsami informacija apie pašaro ir vandens kokybę;
- išsamus veikimo bandomąją medžiagą ir mėginio paėmimo tvarkaraščio aprašymas, pasirinkimo pagrindimas;

- eutanazijos metodas;
- audinių izoliavimo ir konservavimo procedūros;
- graužikų genomo DNR izoliavimo, transgenų išlaisvinimo iš genomo DNR, transgeninės DNR perkėlimo į bakterijas nešiotojas metodai;
- visų ląstelių, priemonių rinkinių ir reagentų (jei naudojami) šaltinis, partijos numeris;
- mutacijų skaičiavimo metodai;
- mutacijų molekulinės analizės metodai ir jų naudojimas mutacijų dažniui tikslinti pagal kloniškumą ir (arba) mutacijų dažniui skaičiuoti, jei reikia.

Rezultatai:

- gyvūno būklė iki bandymo ir per bandymą, įskaitant toksiškumo požymius;
- kūno ir organo masė numarinimo metu;
- apie kiekvieną audinį/gyvūną: mutacijų skaičius, vertintų plokštelių arba kolonijų skaičius, mutacijų dažnis;
- apie kiekvieną audinį/gyvūnų grupę: vienam DNR mėginiui tenkančių pakavimo reakcijų skaičius, bendras mutacijų skaičius, vidutinis mutacijų dažnis, standartinis nuokrypis;
- dozės ir atsako tarpusavio ryšys (jei įmanoma nurodyti);
- apie kiekvieną audinį/gyvūną: nepriklausomų mutacijų skaičius, vidutinis mutacijų dažnis, jeigu molekulinė mutacijų analizė buvo atlikta;
- lygiagrečios kontrolės ir ankstesni kontroliniai duomenys, nurodant intervalus, vidurkius ir standartinius nuokrypius;
- lygiagrečios teigiamos kontrolės (arba nelygiagrečios DNR teigiamos kontrolės) duomenys;
- analitiniai determinantai, jei yra (pvz., DNR koncentracija, naudota pakavimui, DNR sekos nustatymo duomenys);
- statistinės analizės ir metodai, jei taikyti.

Rezultatų aptarimas

Išvada

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- (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, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 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, N° 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, pp. 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.
-

Priedėlis

APIBRĖŽTYS

Dozių davimo laikotarpis: visas laikotarpis, kuriuo gyvūnui duodamos dozės.

Bazių poros pakaita: mutacijos pobūdis, kai viena DNR nukleotido bazė pakeičiama kita DNR nukleotido baze.

Kapsidė: viruso dalelę gaubiantis baltyminis apvalkalėlis.

Cheminė medžiaga: medžiaga arba mišinys.

Kloninė ekspansija: didelio skaičiaus ląstelių pasigaminimas iš vienos (mutavusios) ląstelės.

Kolonijas sudarantis vienetas (angl. cfu): gyvybingų bakterijų skaičiaus matas.

Konkatemerai: ilga ištisinė biomolekulė, susidedanti iš kelių identiškų serijomis susijungusių kopijų.

Cos vieta: vienos gijos DNR 12 nukleotidų segmentas, esantis abiejuose lambda bakteriofago dvigubos gijos genomo galuose.

Delecija: mutacija, per kurią iš genomo prarandamas nukleotidas arba daugiau nukleotidų (seka).

Elektroporacija: elektros impulsų taikymas ląstelių membranos pralaidumui didinti.

Endogeninis genas: genomui būdingas genas.

Ekstrabinominė variacija: didesnė kartotinio populiacijos dalies įvėrcio variacija negu būtų galima tikėtis, jeigu populiacija turėtų binominį skirstinį.

Skaitymo rėmelio poslinkio mutacija: genetinė mutacija, kylanti dėl kelių įsiterpusių arba dingusių nukleotidų, kurių skaičius DNR sekoje, kuriuo koduojamas baltymas/peptidas, nesidalija iš trijų.

Įterpimas: vienos arba kelių nukleotidų bazių porų įterpimas į DNR seką.

Bankas (angl. jackpot): didelis skaičius mutacijų, kurios kilo iš vienos mutacijos dėl kloninės ekspansijos.

Didelės delecijos: daugiau negu keletas kilobazių delecijos DNR (kurios efektyviai nustatomos atliekant Spi⁻ atrankos ir lacZ plazmidžių analizę).

Ligacija: dviejų DNR molekulių galų kovalentiškas susijungimas naudojant DNR ligazę.

Mitogenas: cheminė medžiaga, kuri stimuliuoja ląstelių dalijimosi pradžią, paskatindama mitozę (pvz., ląstelių dalijimąsi).

Neutralus genas: genas, kurio nepaveikė nei teigiami, nei neigiami atrankos veiksniai.

Pakavimas: infekcinių fago dalelių sintezė iš fago kapsidės ir uodegos baltymų preparato ir fago DNR molekulių konkatemero. Paprastai naudojamas DNR, klonuotai į lambda vektorių (atskirtai cos vietomis), pakuoti į infekcines lambda daleles.

Pakavimo efektyvumas: tai, kaip efektyviai supakuoti bakteriofagai yra išskiriami bakterijose nešiotojose.

Plokštelės sudarantis vienetas (angl. pfu): gyvybingų bakteriofagų skaičiaus matas.

Taškinė mutacija: bendra sąvoka, kuria žymimos mutacijos, paveikiančios tik nedidelę DNR seką, įskaitant nedidelius įterpimus, delecijas ir bazių porų pakaitas.

Teigiama atranka: metodas, pagal kurį gali išlikti tik mutacijos.

Reporterinis genas: genas, pagal kurį mutavęs geno produktas yra lengvai nustatomas.

Mėginių ėmimo laikas: laikotarpio iki gyvūnų numarinimo, kuriuo cheminė medžiaga neduodama ir kuriuo neišstaišytos DNR pažeidos fiksuojamos kaip stabilios mutacijos.

Universalus vektorius: vektorius, kuris yra sudarytas taip, kad gali daugintis dviejų skirtingų rūšių nešiotujuose; todėl į universalų vektorių įterptą DNR galima bandyti arba ta DNR galima manipuluoti dviejų skirtingų tipų ląstelėse arba dviejuose skirtinguose organizmuose.

Bandomoji cheminė medžiaga: bet kuri pagal šį bandymų metodą bandoma medžiaga arba mišinys.

Transgeninis: organizmas, kurio genomas buvo pakeistas vieną arba kelis genus perkėlus iš kitų rūšių, ir tai, kas yra su tuo organizmu susiję arba yra jo dalis.“
