

## II

(Незаконодателни актове)

## РЕГЛАМЕНТИ

## РЕГЛАМЕНТ (ЕС) № 900/2014 НА КОМИСИЯТА

от 15 юли 2014 година

за изменение, с цел адаптиране към техническия прогрес, на Регламент (ЕО) № 440/2008 за определяне на методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH)

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 18 декември 2006 г. относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), за създаване на Европейска агенция по химикали, за изменение на Директива 1999/45/ЕО и за отмяна на Регламент (ЕИО) № 793/93 на Съвета и Регламент (ЕО) № 1488/94 на Комисията, както и на Директива 76/769/ЕИО на Съвета и директиви 91/155/ЕИО, 93/67/ЕИО, 93/105/ЕО и 2000/21/ЕО на Комисията <sup>(1)</sup>, и по-специално член 13, параграф 2 от него,

като има предвид, че:

- (1) В Регламент (ЕО) № 440/2008 на Комисията <sup>(2)</sup> се съдържат методите за изпитване за целите на определянето на физичните и химичните свойства, токсичността и токсичността за околната среда на вещества, които методи да бъдат използвани за целите на Регламент (ЕО) № 1907/2006.
- (2) Необходимо е да се актуализира Регламент (ЕО) № 440/2008, за да се включат в него с предимство новите и актуализираните методи за изпитване, приети от ОИСП, за да се вземе предвид техническият напредък, и в съответствие с Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета <sup>(3)</sup>, да се гарантира намаляването на броя на животните, които се използват за опитни цели. Проведени бяха консултации със заинтересованите страни по проекта за настоящия документ.
- (3) Посоченото привеждане в съответствие с техническия напредък съдържа шест нови метода за определяне на токсичност и други видове въздействие върху здравето, в това число изследване за невротоксичност за развиващия се организъм, разширено изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение, изследване за генни мутации *in vivo* при трансгенни гризачи, изпитване *in vitro* за оценка на ефекта върху синтеза на стероидни хормони, както и два метода *in vivo* за оценка на естрогенните и (анти)андрогенните ефекти.
- (4) Поради това Регламент (ЕО) № 440/2008 следва да бъде съответно изменен.
- (5) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на комитета, учреден съгласно член 133 от Регламент (ЕО) № 1907/2006,

<sup>(1)</sup> ОВ L 396, 30.12.2006 г., стр. 1.

<sup>(2)</sup> Регламент (ЕО) № 440/2008 на Комисията от 30 май 2008 година за определяне на методи за изпитване в съответствие с Регламент (ЕО) № 1907/2006 на Европейския парламент и на Съвета относно регистрацията, оценката, разрешаването и ограничаването на химикали (REACH), (ОВ L 142, 31.5.2008 г., стр. 1).

<sup>(3)</sup> Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

*Член 1*

Приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 се изменя в съответствие с приложението към настоящия регламент.

*Член 2*

Настоящият регламент влиза в сила на третия ден след публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави членки.

Съставено в Брюксел на 15 юли 2014 година.

*За Комисията*  
*Председател*  
José Manuel BARROSO

\_\_\_\_\_

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложението към Регламент (ЕО) № 440/2008 се изменя, както следва:

Вмъкват се глави Б.53, Б.54, Б.55, Б.56, Б.57 и Б.58:

**„Б.53. ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА НЕВРОТОКСИЧНОСТ ЗА РАЗВИВАЩИЯ СЕ ОРГАНИЗЪМ**

**УВОД**

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 426 (2007). В Копенхаген през юни 1995 г. работна група на ОИСП за токсичността за репродукцията и за развиващия се организъм обсъди необходимостта от актуализиране на съществуващите указания на ОИСП за изпитвания за токсичност за репродукцията и за развиващия се организъм, и от разработване на нови насоки за крайните точки, които все още не са обхванати (1). Работната група препоръча да бъде изготвено указание за изпитване на невротоксичността за развиващия се организъм въз основа на насоки на Агенцията за опазване на околната среда на САЩ, които впоследствие са били преразгледани (2). През юни 1996 г. в Копенхаген беше проведена втора консултационна среща, за предоставяне на указания на Секретариата за изготвяне на ново указание за изпитване на невротоксичността за развиващия се организъм, включително основните елементи, например подробни данни за избор на животински видове, период на дозиране, период на изпитване, крайни точки, които трябва да бъдат оценени, и критерии за оценка на резултатите. През 1998 г. бяха публикувани Насоки на САЩ за оценка на риска за невротоксичността (3). През октомври 2000 г. бяха проведени успоредно консултационна среща на експерти на ОИСП и работен семинар на Международния институт за науките за живота/Институт за науката за оценка на риска, а през 2005 г. в Токио се проведе консултационна среща на експерти. Тези срещи бяха проведени за обсъждане на научните и техническите въпроси, свързани с настоящите насоки за изпитване, и препоръките от срещите (4)(5)(6)(7) бяха взети предвид при разработването на настоящия метод за изпитване. Допълнителна информация относно прилагането, тълкуването и терминологията, използвана за този метод за изпитване може да бъде намерена в Ръководство на ОИСП № 43 относно „Изпитване и оценка на токсичността за репродукцията“ (8) и Ръководство № 20 относно „Изпитване за невротоксичност“ (9).

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

2. За известен брой химикали се знае, че произвеждат невротоксични ефекти върху развиващия се организъм при хора и други видове (10)(11)(12)(13). Определянето на потенциала за невротоксичност за развиващия се организъм може да е необходимо, за да се направи оценка на токсичните характеристики на даден химикал. Изследванията за невротоксичност за развиващия се организъм се разработват с оглед предоставяне на данни, включително характеризиране на зависимостта доза-отговор, относно възможните функционални и морфологични ефекти върху нервната система на развиващия се организъм на потомството, които могат да възникнат от експозиция *in utero* и по време на ранния стадий на живота.
3. Изпитването за невротоксичност за развиващия се организъм може да се проведе като самостоятелно изследване, да бъде включено в изследване на токсичността за репродукцията и/или в изследване за невротоксичност при полово зрели организми (напр. методи за изпитване Б.34 (14), Б.35 (15), Б.43 (16) или да бъде добавено към изследване на токсичността при пренаталното развитие (напр. метод за изпитване Б.31 (17)). Когато изследването за невротоксичност за развиващия се организъм е включено в друго изследване или е прибавено към друго изследване, е необходимо да се запази целостността и на двата типа изследвания. Всички изпитвания следва да съответстват на приложимото законодателство или насоки на правителствено равнище или на равнище институции за използването на лабораторни животни в научните изследвания (напр. 18).
4. Лабораторията, извършваща изпитването, следва да вземе предвид цялата налична информация за изпитвания химикал преди провеждането на изследването. Такава информация включва идентичността и структурата на химикала; неговите физични и химични свойства; резултатите от всякакви други *in vitro* или *in vivo* изпитвания за токсичност на химикала; токсикологични данни за структурно свързани химикали; и очакваната(ите) употреба(и) на химикала. Тази информация е необходима, за да се удостовери напълно, че това изпитване е свързано със защитата на човешкото здраве и ще бъде от полза при избора на подходяща начална доза.

**ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО**

5. Изпитваният химикал се прилага на животните по време на бременността и кърменето. Майките при животните се подлагат на изпитване за оценка на ефектите при бременни и кърмещи женски и може също така да бъде получена сравнителна информация (майки в сравнение с потомството). За оценка на невротоксичността потомството се избира на случаен принцип от котилото. Оценката се състои от наблюдения за откриване на макроскопски неврологични и поведенчески отклонения, включително оценка на физическото развитие, поведенческата онтогенеза, двигателната активност, двигателната и сензорната функция, и научаването и запаметяването; и оценка на телното на мозъка и невропатологията през постнаталното развитие и след настъпването на полова зрялост.

6. Когато методът за изпитване се прилага като самостоятелно изследване, могат да бъдат използвани допълнителни налични животни във всяка група за специфични невроповеденчески, невропатологични, невротоксични или електрофизиологични процедури, които да допълват данните, получени от изследванията, препоръчани от настоящия метод за изпитване (16)(19)(20)(21). Допълнителните процедури могат да бъдат особено полезни, когато при емпиричните наблюдения, очакваните ефекти, или механизъм/начин на действие има показания за специфичен тип невротоксичност. Тези допълнителни процедури могат да се използват при майките, както и при новородените. В допълнение също могат да бъдат използвани процедури *ex vivo* или *in vitro*, при условие че тези процедури не изменят целостността на процедурите *in vivo*.

#### ПОДГОТОВКА ЗА ИЗПИТВАНЕТО

##### Избор на животински вид

7. Предпочитаният вид е плъхът; ако е необходимо, могат да се използват други видове. Следва да се отбележи обаче, че дните, отнасящи се за периода на бременността и постнаталния период, посочени в настоящия метод за изпитване, са специфични за обичайно използваните породи плъхове, и следва да бъде избран съпоставим период, ако се използва различен вид или необичайна порода. Използването на други животински видове следва да бъде обосновано въз основа на токсикологични, фармакокинетични и/или други данни. Обосновката следва да включва наличието на специфични за съответния животински вид постнатални невроповеденчески и невропатологични оценки. Ако е имало предходно изпитване, в резултат на което са изразени опасения, трябва да бъдат взети под внимание животинският вид/породата, породили опасения. Поради различните характеристики на признаците при различните породи плъхове, следва да има доказателства, че избраната за използване порода има подходящи плодовитост и реагиране. Надеждността и чувствителността на други животински видове за откриване на невротоксичност за развиващия се организъм следва да бъдат документирани.

##### Условия на отглеждане и хранене

8. Температурата в експерименталното помещение с животните трябва да бъде  $22 \pm 3$  °C. Въпреки че относителната влажност трябва да е най-малко 30 % и за предпочитане да не превишава 70 %, освен по време на почистване на помещението, целта следва да е 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като последователността е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. Възможно е също така да се обърне цикълът на осветлението преди чифтосването и за продължителността на изследването, за да бъдат извършени оценките на функционалните и поведенческите крайни точки през периода на тъмнина (при червено осветление), т.е. във времето, през което животните обичайно са активни (22). Всякакви промени в цикъла светлина-тъмнина следва да включват подходящ срок за аклиматизация, който да позволява на животните да се адаптират към новия цикъл. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Типът храна и вода трябва да се отчетат, като и двете следва да бъдат анализирани за наличието на замърсители.
9. Животните могат да се поставят в индивидуални клетки или да се разпределят на малки групи от един и същ пол в общи клетки. Чифтосването трябва да се извърши в клетки, подходящи за тази цел. След доказване на копулация, или не по-късно от 15-ия ден от бременността, чифтосаните животни трябва да бъдат настанени в индивидуални клетки, подходящи за раждане или отглеждане на малките. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Когато наближи раждането, в клетките на бременните женски животни следва да бъдат поставени подходящи гнездови материали. Добре известно е, че неправилното манипулиране или стресът по време на бременност могат да доведат до неблагоприятни последици, включително преждевременна загуба на плода и изменение в ембрионалното/постнаталното развитие. За да се предотврати загубата на плода в резултат от фактори, които не са свързани с третирането, с бременните животни следва да се манипулира внимателно и следва да се избягва стресът от външни фактори, като например прекомерния външен шум.

##### Подготовка на опитните животни

10. Трябва да се използват здрави животни, които са се адаптирали към лабораторните условия и не са били обект на предходни експериментални процедури, освен ако изследването е включено в друго изследване (вж. параграф 3). Опитните животни трябва да се опишат по отношение на вид, порода, източник на доставка, пол, телесно тегло и възраст. Всяко животно трябва да бъде обозначено и маркирано с индивидуален идентификационен номер. Животните от всички опитни групи следва, доколкото е практически възможно, да имат еднакви стойности на телесното тегло и възрастта, и следва да са в рамките на нормалния обхват за изследвания вид и порода. Във всяко ниво на доза следва да се включат млади, полово зрели, нераждали женски животни. Животни от едни и същи родители не следва да се чифтосват и следва да се положат грижи, за да се гарантира това. Ден 0 от бременността (ДБ 0) е денят, в който се наблюдава вагинална запушалка и/или сперматозоиди. Когато от даден доставчик се закупуват животни с определена дата на началото на бременността, следва да се даде достатъчно време за аклиматизация (напр. 2—3 дни). Чифтосаните женски животни следва да бъдат разпределени по непредубеден начин по контролни и опитни групи и, доколкото е възможно, те трябва да бъдат равномерно разпределени между групите (препоръчва се напр. стратифицирана случайна процедура с оглед постигане на равномерно разпределение сред всички групи, като например въз основа на телесното тегло). Женските, осеменени от едно и също мъжко животно, следва да се разпределят равномерно в отделните групи.

## ПРОЦЕДУРА

**Брой и пол на животните**

11. Всяка изпитвана и контролна група трябва да се състои от достатъчен брой бременни женски животни, които следва да бъдат експонирани на изпитвания химикал, за да се гарантира получаването на достатъчно на брой живо поколение за оценка на невротоксичността. Общо 20 котила се препоръчват за всяко ниво на доза. Планирането на групи с повторение или отлагане на дозирането е разрешено, ако е достигнат общият брой на котилата на група и ако се използват подходящи статистически модели за отчитане на повторенията.
12. На 4-ия постнатален ден (ПНД) или преди него (денят на раждането е ПНД 0), размерът на всяко котило следва да бъде коригиран чрез елиминиране на излишните новородени животни чрез подбор на случаен принцип, за да се получи еднаква големина на котилото за всички котила (23). Големината на котилото следва да не превишава средната големина на котилото за използваната порода гризачи (8—12). Котилото трябва, доколкото е възможно, да се състои от равен брой мъжки и женски новородени животни. Избирателното елиминиране на новородени животни, например въз основа на телесно тегло, не е уместно. След стандартизирането на котилото (бракуване) и преди понататъшното изпитване на функционалните крайни точки, отделните новородени, предвидени за изпитване преди отбиването или след отбиването, следва да бъдат идентифицирани поотделно, като се използват всякакви подходящи хуманни методи за идентификация на новородени животни (например 24).

**Разпределяне на животни за функционални и поведенчески изпитвания, измерване на теглото на мозъка и оценка на невропатологията**

13. Методът за изпитване дава възможност за различни подходи по отношение на разпределянето на животните, експонирани *in utero* и чрез лактация във функционални и поведенчески изпитвания, определяне на половото съзряване, измерване на теглото на мозъка и оценка на невропатологията (25). Други изпитвания на невроповеденчески функции (напр. социално поведение), неврохимия или невропатология могат да се добавят според случая, при условие че целостността на първоначално изискваните изпитвания не е застрашена.
14. Новородените животни се избират от всяка група с определена доза и се разпределят за оценка на крайните точки на 4-тия ПНД или след него. Подборът на новородени животни трябва да бъде извършен по такъв начин, че доколкото е възможно, от всяко котило двата пола във всяка група с определена доза да са представени поравно при всички изпитвания. За изпитване на двигателната активност трябва да се изпитва една и съща двойка мъжки и женски новородени животни във всички възрасти преди отбиването (вж. параграф 35). За всички други изпитвания, същите или отделни двойки от мъжки и женски животни могат да бъдат разпределени към различни поведенчески изпитвания. Може да се наложи различни новородени животни да бъдат разпределени към изпитвания на отбити в сравнение с полово зрели животни, свързани с когнитивната функция, с цел да се избегне невъзможността за разграничаване на ефектите върху тези измервания от възрастта и предхождащото обучение (26)(27). При отбиването (ПНД 21) новородените животни, които не са били подбрани за изпитване, могат да бъдат отстранени по хуманен начин. Всякакви изменения в разпределението на новородените животни следва да бъдат докладвани. Измерваната единица за целите на статистиката следва да бъде котилото (или майката), а не новороденото животно.
15. Съществуват различни начини за разпределяне на новородени за изследване преди отбиването и след отбиването, за когнитивни изпитвания, изследвания на патологията и т.н. (виж фигура 1 за общата схема и допълнение 1 за примери на разпределяне). Препоръчваният минимален брой на животните във всяка група с определена доза за изследвания преди отбиването и след отбиването са, както следва:

|                                                                     |                       |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Клинични наблюдения и телесно тегло                                 | Всички животни        |
| Подробни клинични наблюдения                                        | 20/пол (1/пол/котило) |
| Тегло на мозъка (след фиксиране) ПНД 11—22                          | 10/пол (1/котило)     |
| Тегло на мозъка (нефиксиран) ~ ПНД 70                               | 10/пол (1/котило)     |
| Невропатология (фиксиране чрез имерсия или чрез перфузия) ПНД 11—22 | 10/пол (1/котило)     |
| Невропатология (фиксиране чрез перфузия) ПНД ~ 70                   | 10/пол (1/котило)     |

|                                          |                                  |
|------------------------------------------|----------------------------------|
| Полова зрялост                           | 20/пол (1/пол/котило)            |
| Други ориентери за развитието (по избор) | Всички животни                   |
| Поведенческа онтогенеза                  | 20/пол (1/пол/котило)            |
| Двигателна активност                     | 20/пол (1/пол/котило)            |
| Двигателна и сензорна функция            | 20/пол (1/пол/котило)            |
| Научаване и запаметяване                 | 10/пол <sup>(а)</sup> (1/котило) |

(<sup>а</sup>) В зависимост от чувствителността на изпитванията за когнитивната функция следва да бъде взето предвид изследване на значително по-голям брой животни, например до 1 мъжко и 1 женско от котило (за разпределяне на животните вж. Допълнение 1) (допълнителни указания относно размера на извадката са предоставени в Ръководство № 43 на ОИСП (8)).

### Дозирание

16. Следва да се приложат най-малко три нива на доза и да се използва паралелна контролна група. Дозите следва да бъдат избрани в такова съотношение, че с нарастването им да се наблюдава ясно изразено засилване на токсичните ефекти. Освен ограниченията от физично и химично естество, или такива в резултат от биологични свойства на химикала, най-високото ниво на доза трябва да се избира с цел да предизвика известна токсичност при майката (напр. клинични признаци, намаляване на нарастването на телесното тегло (не повече от 10 %) и/или доказване на ограничена от дозата токсичност в прицелен орган). Високата доза може да бъде ограничена до 1 000 mg на kg телесно тегло дневно, с някои изключения. Например, очакваната експозиция на хора може да покаже необходимост да се използва по-високо ниво на доза. Като алтернатива следва да се провеждат пилотни изследвания или предварителни изследвания за определяне на обхвата за определянето на най-високата доза, която да се използва за постигане на минимална степен на токсичност при майката. Ако в стандартно изследване за токсичност за развиващия се организъм или в пилотно изследване е доказано, че изпитваният химикал е токсичен за развиващия се организъм, най-високата доза трябва да бъде максималната доза, която не предизвиква прекомерна токсичност за поколенията, или смъртност *in utero*, или сред новородените, или малформации, достатъчни, за да се изключи съдържателна оценка на невротоксичността. Най-ниската доза следва да има за цел да не предизвиква никакви прояви на токсичност, включително невротоксичност, за майката или развиващия се организъм. Следва да се подбират постепенно намаляващи нива на доза с оглед установяване на всеки един свързан с дозата отговор и на нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL), или дози в близост до границата на откриване, които да позволят определянето на еталонна доза. В повечето случаи най-подходящо е да се използва двукратно до четирикратно намаление на всяка доза спрямо най-близката по-висока доза, като включването на допълнителна четвърта група с определена доза често е за предпочитане пред използването на твърде големи интервали между дозите (напр. повече от 10 пъти).
17. Нивата на дозите следва да се подберат, като се вземат под внимание всички съществуващи токсикологични данни, както и допълнителна информация за метаболизма и токсикокинетиката на изпитвания химикал или на подобни материали. Тази информация може да се използва също и при обосновката на схемата на дозиране. Директното дозиране на новородени животни трябва да се разглежда в светлината на информацията за експозицията и фармакокинетиката (28)(29). Преди провеждането на изследвания за директно дозиране следва внимателно да се разгледат предимствата и недостатъците (30).
18. Паралелната контролна група следва да бъде с фиктивно третиране или контролна група на носител в случаите, когато за въвеждането на изпитвания химикал се използва носител. За всички животни обичайно се прилага един и същ обем от изпитвания химикал или от носителя, в съответствие с телесното тегло. Когато за улесняване на дозирането се използва носител или друга добавка, следва да се вземат предвид следните характеристики: ефекти върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържането на изпитвания химикал; ефекти върху химичните свойства на изпитвания химикал, които могат да изменят токсикологичните му характеристики; и ефекти върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните. Носителят следва да не предизвиква ефекти, които биха могли да попречат на тълкуването на изследването, също така следва да не е токсичен от невроповеденческа гледна точка и да няма ефекти върху репродукцията или развиващия се организъм. За нови носители в допълнение към контролна група на носител следва да бъде включена група с фиктивно третиране. С животните в контролната(ите) група(и) следва да се борави по същия начин, както с животните от групата за изпитване.

### Прилагане на дозите

19. Изпитваният химикал или носителът следва да бъдат прилагани по пътя, който в най-голяма степен съответства на потенциалната експозиция на човека, и въз основа на наличната информация за метаболизма и разпределението в изпитваните животни. Пътят на прилагане обичайно е орален (напр. чрез сонда, чрез храна, чрез питейна вода), но могат да се използват други пътища (например чрез кожата, чрез вдишване) в зависимост от характеристиките и очакваните или познатите пътища на експозиция на човека (допълнителни насоки са представени в Ръководство № 43 (8)). Необходимо е да се даде обосновка за избрания път на прилагане. Изпитваният химикал следва да се прилага приблизително по същото време всеки ден.
20. Дозата, прилагана за всяко животно, се определя най-често въз основа на последното измерване на индивидуалното телесно тегло. Въпреки това трябва да се подхожда предпазливо, когато се определят дозите през последната третина от бременността. Ако е забелязана прекалена токсичност при третираните майки, тези животни следва да бъдат умъртвени по хуманен начин.
21. Изпитваният химикал или носителът следва, като минимум, да се прилагат ежедневно при чифтосаните женски животни от времето на имплантация (ДБ 6) по време на кърменето (ПНД 21), така че новородените да бъдат експонирани на въздействието на изпитвания химикал в периодите на пренаталното и постнаталното неврологично развитие. Възрастта, на която да започне дозирането, и продължителността и честотата на дозиране могат да бъдат коригирани, ако има доказателства в подкрепа на постановка на изпитването, която съответства в по-голяма степен на експозицията на човека. Продължителността на дозирането следва да се коригира за други видове, за да се гарантира експозиция през всички ранни периоди на развитието на мозъка (т.е. еквивалентна на пренаталното и ранното постнатално развитие на човешкия мозък). Дозирането може да започне от датата на започване на бременността (ДБ 0), въпреки че трябва да се обърне внимание на потенциала на изпитвания химикал да предизвиква предимплантационна загуба. При прилагане, започващо от ДБ 6, този риск би бил избягнат, но етапите на развиващия се организъм между ДБ 0 и ДБ 6 не биха били третирани. Когато дадена лаборатория закупува животни с определена дата на чифтосването, се счита за непрактично дозирането да започва в ДБ 0, и по този начин ДБ 6 би бил уместен ден за започването. Лабораторията, провеждаща изпитването, следва да определи схемата на третиране в съответствие с относимата информация за ефектите на изпитвания химикал, с предходния опит и с логистични съображения; това може да включва разширяване на периода на дозирането след отбиването. Дозиране не следва да се прилага в деня на раждането за тези животни, при които раждането на цялото потомство още не е приключило. Като цяло се приема, че експозицията на новородените ще се извърши чрез майчиното мляко; въпреки това обаче трябва да бъде взето предвид директно дозиране в тези случаи, в които не е доказана продължителна експозиция на потомството. Доказателства за непрекъсната експозиция могат да бъдат изведени *например* от фармакокинетична информация, токсичност за потомството или промени в биомаркерите (28).

### НАБЛЮДЕНИЯ

#### Наблюдения на майки

22. Всички майки трябва да бъдат внимателно наблюдавани най-малко веднъж на ден, във връзка с тяхното здравословно състояние, включително за заболяемост и смъртност.
23. По време на периодите на третиране и наблюдение следва периодично да се извършват по-подробни клинични наблюдения (най-малко два пъти при дозиране през периода на бременността и два пъти през периода на кърменето) като се използват най-малко десет майки за всяко ниво на доза. Животните следва да се наблюдават извън клетката от обучени техници, които не са запознати с третирането на животните, като се използват стандартни процедури за свеждане до минимум на отклоненията, свързани със стреса на животните и с наблюдателите, и за максимална надеждност при резултатите между различните наблюдатели. Когато е възможно, е препоръчително наблюденията в дадено изследване да се извършват от един и същ специалист.
24. Наличието на наблюдавани признаци трябва да се записва. Когато е възможно, големината (размерът) на наблюдаваните признаци също трябва да бъде записана. Клиничните наблюдения трябва да включват изменения в кожа, козина, очи, лигавици, поява на секрция и автономна дейност (напр. лакримация, пилоерекция, размер на зениците, необичайни респираторни модели и/или дишане през устата и някакви необичайни признаци на уриниране и дефекация), но без да се ограничават до тях.
25. Всякакви необичайни отговори, свързани с положение на тялото, ниво на активност (напр. понижено или повишено проучване на стандартната площ) и координация на движенията, трябва също да бъдат отбелязани. Следва да бъдат записвани промените в походката (напр. клатушкаща се „патешка“ походка, атаксия), стойката (напр. прегърбване) и реактивността при боравене, поставяне или други стимули на околната среда, както и наличието на клонични или тонични движения, конвулсии, тремори, стереотипно (например прекомерно поддържане на външния вид, необичайни движения на главата, повтарящо се обикаляне в кръг), необичайно (например хапане или прекомерно облизване, самоосакатяване, вървене назад, издаване на звуци) или агресивно поведение.

26. Признаците за токсичност следва да се записват, включително ден на поява, по кое време през деня, степен и продължителност.
27. Животните следва да бъдат теглени по време на дозиране поне веднъж седмично в хода на изследването, в деня на раждането или близо до него, както и в ПНД 21 (отбиване). При проучвания със сонда майките следва да бъдат теглени поне два пъти седмично. Дозите следва да бъдат коригирани по време на всяко измерване на телесното тегло, както е уместно. Консумацията на храна трябва да се измерва веднъж седмично, като минимум по време на бременността и кърменето. Консумацията на вода трябва да се измерва поне един път седмично, ако експозицията е чрез осигуряването на вода.

#### Наблюдения на потомството

28. Всички животни от потомството трябва да бъдат внимателно наблюдавани най-малко ежедневно за признаци на токсичност и за заболяемост и смъртност.
29. По време на периодите на третиране и наблюдение следва периодично да се извършват по-подробни клинични наблюдения на потомството. Потомството (най-малко едно новородено от пол от котило) следва да се наблюдава от обучени техници, които не са запознати с третирането на животните, като се използват стандартни процедури за свеждане до минимум на отклоненията, и за максимална надеждност при резултатите между различните наблюдатели. Когато е възможно, е препоръчително наблюденията да се извършват от един и същ техник. Като минимум, крайните точки, описани в параграфи 24 и 25, следва да бъдат подложени на мониторинг, както е подходящо за наблюдавания етап на развитие на развиващия се организъм.
30. Всички признаци за токсичност в потомството следва да се записват, включително ден на поява, по кое време през деня, степен и продължителност.

#### Физически ориентир и ориентир за развиващия се организъм

31. Промените в ориентирите за развитието преди отбиването (например разтварянето на ушната мида, отварянето на очите, поникването на резците) са тясно свързани с телесното тегло (30)(31). Телесното тегло може да бъде най-добрият показател за физическото развитие. Следователно измерването на ориентирите за развитието се препоръчва само когато преди това е доказано, че тези крайни точки ще предоставят допълнителна информация. Графикът за оценката на тези параметри е посочен в Таблица 1. В зависимост от очакваните ефекти и резултатите от първоначалните измервания, може да е препоръчително да се добавят допълнителни времеви точки или да се извършат измервания при други етапи на развитие.
32. Препоръчително е при оценката на физическото развитие да се използва възрастта след половия акт вместо постнаталната възраст (33). Ако новородените се изпитват в деня на отбиването, препоръчва се това изпитване да се извърши преди действителното отбиване, за да се избегне водещият до невъзможност за разграничаване ефект от стреса, свързан с отбиването. В допълнение към това изпитването на новородените животни след отбиването не следва да се провежда през двата дни след отбиването.

Таблица 1

#### График за оценката на физическите ориентир, ориентирите за развиващия се организъм и функционалните/поведенческите крайни точки <sup>(a)</sup>

| Крайни точки | Възrastови периоди | Преди отбиване <sup>(b)</sup> | Млади <sup>(b)</sup> | Млади полово зрели <sup>(b)</sup> |
|--------------|--------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
|--------------|--------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------------|

#### Физически ориентир и ориентир за развиващия се организъм

| Наблюдения на телесното тегло и Клинични наблюдения | седмично <sup>(c)</sup> | най-малко веднъж на всеки две седмици | най-малко веднъж на всеки две седмици |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Тегло на мозъка                                     | ПНД 22 <sup>(d)</sup>   |                                       | при умъртвяване                       |
| Невропатология                                      | ПНД 22 <sup>(d)</sup>   |                                       | при умъртвяване                       |
| Полова зрялост                                      | —                       | според случая                         | —                                     |
| Други ориентир за развитието <sup>(e)</sup>         | според случая           | —                                     | —                                     |

| Крайни точки \ Възрастови периоди             | Преди отбиване <sup>(b)</sup> | Млади <sup>(b)</sup> | Млади полово зрели <sup>(b)</sup> |
|-----------------------------------------------|-------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| <b>Функционални/поведенчески крайни точки</b> |                               |                      |                                   |
| Поведенческа онтогенеза                       | Най-малко две измервания      |                      |                                   |
| Двигателна активност (включително привикване) | 1-3 пъти <sup>(f)</sup>       | —                    | веднъж                            |
| Двигателна и сензорна функция                 | —                             | веднъж               | веднъж                            |
| Научаване и запаметяване                      | —                             | веднъж               | веднъж                            |

<sup>(a)</sup> В тази таблица се посочва минималният брой пъти на извършване на измерванията. В зависимост от очакваните ефекти и резултатите от първоначалните измервания, може да е препоръчително да се добавят допълнителни времеви точки (напр. възрастни животни) или да се извършат измервания при други етапи на развитие на развиващия се организъм.

<sup>(b)</sup> Препоръчва се новородените животни да не се изпитват по време на двата дни след отбиването им (вж. параграф 32). Препоръчваните възрасти за изпитване на млади животни са: научаване и запаметяване = ПНД  $25 \pm 2$ ; двигателна и сензорна функция = ПНД  $25 \pm 2$ . Препоръчваните възрасти за изпитване на млади полово зрели животни са ПНД 60—70.

<sup>(c)</sup> Телесните тегла трябва да се измерват поне два пъти седмично когато директно се дозира новородени животни за коригиране на дозите във време на бързо наддаване на телесно тегло.

<sup>(d)</sup> Теглото на мозъка и невропатологията могат да бъдат оценени на някакъв по-ранен етап (напр. ПНД 11), ако е целесъобразно (вж. параграф 39).

<sup>(e)</sup> Други ориентир за развиващия се организъм в допълнение към телесното тегло (напр. отваряне на очите) следва да се записват, когато е подходящо (вж. параграф 31).

<sup>(f)</sup> Вж. параграф 35.

33. Живите новородени животни трябва да бъдат преброени и полът им да бъде определен, напр. чрез визуална проверка или чрез измерване на разстоянието между ануса и половите органи (34)(35), и всяко новородено животно в рамките на дадено котило трябва да бъде претеглено отделно при раждане или скоро след това, поне веднъж седмично по време на кърменето и най-малко веднъж на всеки две седмици след това. При оценката на половото съзряване поне за един мъжки и един женски индивид от котило трябва да се определят възрастта и телесно тегло на животното при настъпване на отворено състояние на вагината (36) или на отделяне на препуциума (37).

#### Поведенческа онтогенеза

34. Онтогенезата на избрани поведения следва да се измерва при най-малко едно новородено от всеки пол от котило по време на подходящия възрастов период, като бъдат използвани едни и същи новородени животни през всички дни на изпитване за всички оценявани поведения. Дните на измерване трябва да са разпределени равномерно през този период, за да се определи или нормалната, или свързаната с третирането промяна в онтогенезата на това поведение (38). Ето например някои от поведенията, чиято онтогенеза би могла да бъде оценена: рефлекс за пазене на равновесие, отрицателен геотаксис и двигателна активност (38)(39)(40).

#### Двигателна активност

35. Двигателната активност трябва да бъде наблюдавана (41)(42)(43)(44)(45) по време на периода преди отбиването и периода на полово зрялост. За изпитване по време на отбиването, вж. параграф 32. Провеждането на изпитването следва да бъде достатъчно дълго, за да се докаже привикване по време на провеждането за нетретиран контроли. Използването на двигателната активност за оценка на поведенческата онтогенеза силно се препоръчва. Ако се използва за изпитване на поведенческата онтогенеза, тогава при изпитването следва да се използват едни и същи животни за всички провеждани изпитвания преди отбиването. Изпитванията трябва да бъдат достатъчно чести, за да се оцени онтогенезата на привикването по време на провеждането (44). Това може да изисква три или повече периоди от време преди и включително в деня на отбиване (напр. ПНД 13, 17, 21). Изпитването на същите животни, или животни от едно котило, следва също така да се провежда в полово зряла възраст в близост до прекратяването на проучването (напр. ПНД 60—70). При необходимост може да се извършва изпитване в допълнителни дни. Двигателната активност трябва да се наблюдава посредством автоматичен апарат за записване на активността, способен да улови и пониженията, и повишенията в активността (т.е. базовата активност, измервана от апарата, не следва да бъде с толкова ниска стойност, че да изключва възможността за откриване на пониженията, нито с толкова висока, че да изключва откриване на повишенията на активността). Всяко устройство следва да бъде изпитвано чрез стандартни процедури, за да се гарантира, доколкото е възможно, надеждността на работата при различните уреди и в различните дни. Доколкото е възможно, третираните групи трябва да бъдат балансирани между устройствата. Всяко животно трябва да се изпитва поотделно. Групите за третиране следва да бъдат балансирани по време на изпитването по такъв начин, че да се избегне невъзможност за разграничаване от циркадните ритми на активност. Следва да се положат усилия, за да се гарантира, че колебанията в условията на изпитването

са минимални и не са систематически свързани с третирането. Сред променливите, които могат да засегнат редица измервания, свързани с поведението, включително двигателната активност, са равнището на звука, размерът и формата на изпитвателната клетка, температурата, относителната влажност, условията на осветление, миризмите, използването на обитаваната от животното клетка, или на нова изпитвателна клетка, и свързаните с околната среда причини за разсейване.

### **Двигателна и сензорна функция**

36. Двигателната и сензорна функция следва да бъде подробно изследвана най-малко веднъж за млади животни и веднъж за млади половозрепи животни (напр. ПНД 60—70). За изпитване по време на отбиването, вж. параграф 32. Следва да се извършват достатъчно изпитвания, за да се гарантира адекватно количествено вземане на проби на сензорни модалности (напр. сомато-сензорни, вестибуларни) и двигателни функции (напр. сила, координация). Няколко примера за изпитвания на двигателната и сензорна функция са реакцията на екстензор на натиск (46), рефлексът за пазене на равновесие, привикването към интензивни слухови стимули (47)(48)(40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) и евокираните потенциали (55).

### **Изпитвания за научаване и запаметяване**

37. Следва да се проведе изпитване за научаване и запаметяване — след отбиването (напр.  $25 \pm 2$  дни) и при млади половозрепи животни (ПНД 60 и по-възрастни). За изпитване по време на отбиването, вж. параграф 32. Същото (ите) или отделно(и) изпитване(ия) може да се използва(т) при тези два етапа на развитие. Разрешена е известна гъвкавост при избора на изпитването(ията) за научаване и запаметяване при отбити и половозрепи плъхове. Въпреки това, изпитването(ията), трябва да бъде(ат) проектирано(и) по такъв начин, че да изпълнява(т) два критерия. Първо, научаването трябва да се оценява или като промяна при няколко повтарящи се опита или сесии за научаване, или в изпитвания, които включват един опит, спрямо състояние, при което се контролират неасоциативните ефекти от обучението. Второ, изпитването(ията), следва да включва(т) някои мерки за запаметяване (краткосрочно или дългосрочно) в допълнение към първоначалното научаване (придобиване), но тази мярка за запаметяване не може да бъде докладвана при липса на измерване на придобиването, получено от същото изпитване. Ако изпитването(ията) за научаване и запаметяване разкрие(ят) ефект на изпитвания химикал, могат да бъдат предвидени допълнителни изпитвания, за да се изключат алтернативни тълкувания, основаващи се на промени в сетивния, мотивационния и/или двигателния капацитети. В допълнение към посочените по-горе два критерия се препоръчва изпитването за научаване и запаметяване да се избира въз основа на доказаната му чувствителност към изследвания клас химикал, ако е налична такава информация в литературата. При липса на такава информация примери за изпитвания, които биха могли да бъдат извършени при спазването на горепосочените критерии, включват: пасивно избягване (43)(56)(57), определяне на обект след закъснение за половозрепи плъхове (58) и за плъхове преди отбиване (59), кондициониране на обонянието (43)(60), воден лабиринт на Morris (61)(62)(63), лабиринт на Biel или Cincinnati (64)(65), лабиринт с радиално рамо (66) Т-образен лабиринт (43) придобиване и поддържане на програмирано поведение (26)(67)(68). Допълнителни изпитвания са описани в литературата за отбити (26)(27) и половозрепи плъхове (19)(20).

### **Оглед при аутопсия**

38. Животните майки могат да бъдат подложени на евтаназия след отбиването на потомството.
39. Невропатологичната оценка на потомството се провежда, като се използва тъкани от животни, умъртвени по хуманен начин в ПНД 22 или на по-ранен етап между ПНД 11 и ПНД 22, както и при прекратяване на проучването. За потомството, умъртвено през ПНД 22, следва да бъдат оценени мозъчни тъкани; за животни, умъртвени при прекратяване на изпитването, трябва да бъдат оценени тъкани както от централната нервна система (ЦНС), така и от периферната нервна система (ПНС). Животни, умъртвени през ПНД 22 или преди това, могат да бъдат фиксирани или чрез имерсия, или и чрез перфузия. Животни, умъртвени при прекратяване на проучването, следва да бъдат фиксирани чрез перфузия. Всички аспекти от подготовката на проби от тъкани, от перфузията на животни през дисекцията на проби от тъкани, обработката на тъкани и оцветяването на предметните стъкла, трябва да са по план, балансиран така, че всяка партида да съдържа представителни извадки от всяка група с определена доза. Допълнителни насоки относно невропатологията могат да бъдат намерени в Ръководство № 20 на ОИСР (9), виж също (103).

### **Обработка на проби от тъкани**

40. Всички макроскопски аномалии, видими по време на аутопсията, следва да се отбелязват. Вземите проби от тъкани следва да са представителни за всички основни области на нервната система. Тъканните проби трябва да бъдат задържани в подходящ фиксатор и обработвани съгласно стандартизирани публикувани хистологични протоколи (69)(70)(71)(103). Включването в парафин е приемливо за тъкани от ЦНС и ПНС, но използването на осмий след фиксирането, заедно с включване в епоксидна смола, може да бъде подходящо когато се изисква по-висока разделителна способност (например за периферните нерви, когато има съмнение за наличието на периферна невропатия и/или за морфометричен анализ на периферните нерви). Мозъчната тъкан, вземана за морфометричен анализ, следва

да бъде включена в подходяща среда при всички нива на доза и по едно и също време, за да бъдат избегнати артефакти на свиване, които могат да бъдат свързани с продължително съхранение във фиксатор (6).

### Невропатологично изследване

41. Целите на качествено изследване са:

- i) идентифициране на области в нервната система, доказващи невропатологични изменения;
- ii) идентифициране на типове невропатологични изменения в резултат от експозиция на изпитвания химикал; както и
- iii) определяне на обхвата на силата на невропатологичните изменения.

Представителни хистологични срезове от тъканните проби трябва да бъдат изследвани микроскопски от подходящо обучен патолог за доказване на невропатологични изменения. Всички невропатологични изменения трябва да бъдат определени със субективна степен, показваща силата им. Оцветяване с хематоксилин и еозин може да е достатъчно за оценката на срезове от мозък за животни, умъртвени по хуманен начин през ПНД 22 или по-рано. За срезове от тъкани от ЦНС и ПНС от животни, умъртвени при прекратяване на изследването обаче се препоръчва оцветяване за миелин (напр. luxol fast blue/cresyl violet) и сребърно оцветяване (напр. оцветяване по Билшовски или по Бодиан). В зависимост от професионалната преценка на патолога и от вида на наблюдаваните изменения, може да се счете за подходящо друго оцветяване за идентифициране и характеризиране на конкретни типове изменения (напр. глиален фибриларен кисел протеин (GFAP) или хистохимия на лецитин за оценка на глиални и микроглиални изменения (72), Fluoro-jade за откриване на некроза (73)(74), или сребърно оцветяване, специфично за неврална дегенерация (75)).

42. Следва да бъде извършена морфометрична (количествена) оценка, тъй като тези данни могат да допринесат за откриване на свързан с третирането ефект и са полезни при тълкуването на свързани с третирането разлики в телното или морфологията на мозъка (76)(77). Проби от нервна тъкан трябва да се вземат и подготвят, за да се даде възможност за извършване на морфометрична оценка. Морфометричните оценки могат да включват например линейни измервания или измерване на площ на специфични области от мозъка (78). Линейните измервания и измерването на площ изискват използване на хомоложни срезове, внимателно подбрани въз основа на надеждни микроскопски ориентир (6). Може да се използва стереология за установяване на свързани с третирането ефекти върху параметри като обем или брой на клетките за специфични невроанатомични области (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Мозъкът трябва да бъде изследван за всякакви доказателства за свързани с третирането невропатологични изменения, като следва да бъдат взети подходящи проби от всички основни области на мозъка (напр. обонятелни луковичи, мозъчна кора, хипокамп, базални ганглии, таламус, хипоталамус, среден мозък (тектум, тегментум и малкомозъчни крачета), мост, продълговат мозък, малък мозък), за да се осигури задълбочено проучване. Важно е срезовете за всички животни да се вземат на едно и също ниво. При умъртвени по хуманен начин при прекратяване на изследването половозрепли животни следва да се пробовземат представителни срезове от гръбначния мозък и ПНС. Изследваните области следва да включват окото с оптичния нерв и ретината, гръбначния мозък при шийното и поясното надбеление, дорзалните и вентралните коренови влакна, проксималния седалищен нерв, проксималния тибиаден нерв (при коляното) и тибиаденото нервно разклонение на мускулите на прасеца. Срезове от гръбначния мозък и периферните нерви следва да включват както напречни, така и надлъжни срезове.

44. Невропатологичната оценка следва да включва изследване за показания за свързани с развиващия се организъм увреждания на нервната система (6)(85)(86)(87)(88)(89), в допълнение към клетъчните изменения (напр. невронна вакуолизация, дегенерация, некроза) и изменения в тъканите (напр. глиоза, левкоцитна инфилтрация, образуване на кисти). В това отношение е важно свързаните с третирането ефекти да бъдат разграничени от нормалните събития, свързани с развиващия се организъм, за които е известно, че се появяват на етапа на развитие, съответстващ на времето на умъртвяването (90). Примери за важни изменения, показателни за инсулт, свързан с развиващия се организъм, включват, но не се ограничават до:

- изменения в макроскопския размер или формата на обонятелните луковичи, главния мозък или малкия мозък;
- изменения в относителния размер на различни области на мозъка, включително намаляване или увеличаване на размера на областите вследствие на загуба или устойчивост на обичайно преходни популации от клетки или проекции на аксони (напр. външен зародишен пласт на малкия мозък, мазолесто тяло);
- изменения в пролиферацията, миграцията и диференциацията, показание за което са области с необикновено силна апоптоза или некроза, клъстери или разпръснати популации на ектопични, дезориентирани или деформирани неврони или изменения в относителния размер на отделните пластове на коровите структури;

- изменения в моделите на миелинизация, включително цялостно намаляване на размера или изменено оцветяване на миелинизираните структури;
- доказателства за хидроцефалия, по-специално разширяване на вентрикулите, стеноза на водопровода на средния мозък и изтъняване на полукълбата на големия мозък.

#### **Анализ на зависимостта доза-отговор за невропатологични изменения**

45. Препоръчва се следната поетапна процедура за качествени и количествени невропатологични анализи. Първо, срезове от групата с висока доза се сравняват с тези от контролната група. Ако не се открива доказателство за невропатологични изменения в животните от групата с висока доза, не се изисква по-нататъшен анализ. Ако се открие доказателство за невропатологични изменения в групата с висока доза, тогава се изследват животните от групите със средна и ниска доза. Ако групата с висока доза е умъртвена поради смърт или друга невъзможна за разграничаване токсичност, групите с висока и със средна доза трябва да се анализират за невропатологични изменения. Ако има показания за невротоксичност в групите с по-ниски дози, в тези групи трябва да се извърши невропатологичен анализ. Ако при качествено или количествено изследване бъдат открити свързани с третирането невропатологични изменения, зависимостта на появата, честотата и степента на силата на уврежданията или на морфометричните изменения от дозата следва да се определи въз основа на оценка на всички животни от всички групи с определена доза. Всички области на мозъка, които показват някакво доказателство за невропатологично изменение, следва да бъдат включени в тази оценка. За всеки тип увреждане следва да бъдат описани характеристиките, използвани за определянето на всяка степен на сила, като се посочват елементите, използвани за разграничаване на всяка степен. Честотата на всеки тип увреждане и неговата степен на сила следва да бъдат записани и следва да бъде направен статистически анализ с цел оценка на естеството на зависимостта доза-отговор. Препоръчва се използването на кодирани предметни стъкла (91).

#### **ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ**

##### **Данни**

46. Данните следва да се докладват индивидуално и обобщени в табличен вид, като за всяка изпитвана група се показват типовете промени и броят на майките, потомството по пол, и котилата, в които се проявява всеки тип промяна. Ако е извършена директна постнатална експозиция на потомството, пътят, продължителността и периодът на експозиция следва да се докладват.

#### **Оценка и тълкуване на резултатите**

47. Чрез изследването за невротоксичност за развиващия се организъм се осигурява информация за ефектите от многократната експозиция на даден химикал *in utero* и през ранното постнатално развитие. Тъй като вниманието е съсредоточено както върху общата токсичност, така и върху крайните точки на невротоксичност за развиващия се организъм, резултатите от изследването позволяват да се разграничат неврологичните ефекти върху развиващия се организъм, които се явяват при отсъствие на обща токсичност, свързана с майката, и ефектите, които се проявяват само на равнища, които са токсични и за майката (27). Поради сложните взаимовръзки между плана на изследването, статистическия анализ и биологичната значимост на данните, адекватното тълкуване на данните за токсичността за развиващия се организъм включват експертна оценка (107)(109). При тълкуването на резултатите от изпитването следва да се използва подход, основан на тежестта на доказателствата (20)(92)(93)(94). Моделите на поведенчески или морфологични констатации, ако има такива, както и доказателства за зависимостта доза-отговор следва да бъдат обсъдени. В това охарактеризиране трябва да бъдат включени данни от всички изследвания, относими към оценката на невротоксичността за развиващия се организъм, включително епидемиологични изследвания върху човека или докладвани случаи и експериментални изследвания върху животни (напр. токсикокинетични данни, информация за зависимост структура-активност, данни от други изследвания за токсичност). Това включва връзката между дозите от изпитвания химикал и наличието или отсъствието, появата и степента на всякакви невротоксични ефекти за всеки пол (20)(95).
48. Оценката на данните следва да включва обсъждане както на биологичната, така и на статистическата значимост. Статистическият анализ следва да бъде разглеждан като инструмент, който насочва, а не определя тълкуването на данните. Липса на статистическа значимост не следва да е единствената обосновка за заключение за липсата на свързан с третирането ефект, точно както статистическата значимост не следва да е единствената обосновка за заключение за наличие на свързан с третирането ефект. За предпазване от евентуални неверни отрицателни констатации и присъщите затруднения при „доказване на отрицателното“ следва да бъдат обсъдени положителните и контролните данни за минали периоди, особено когато няма ефекти, свързани с третирането (102)(106). Вероятността за неверни положителни данни следва да се обсъди в светлината на общата статистическа оценка на данните (96). Оценката следва да включва връзката (ако има такава) между наблюдаваните невропатологични и поведенчески изменения.

49. Всички резултати следва да се анализират с помощта на статистически модели, които са подходящи от гледна точка на плана на изследването (108). Изборът на даден параметричен или непараметричен анализ следва да бъде обоснован, като се вземат предвид фактори като естеството на данните (трансформирани или не), и тяхното разпределение, както и относителната надеждност на избрания статистически анализ. Целта и планът на изследването следва да насочат избора на статистически анализи, за да се сведат до минимум грешките от тип I (неверни положителни) и тип II (неверни отрицателни) (96)(97)(104)(105). Изследвания на развиващия се организъм, използващи многораждащи видове, при които се изпитват множество новородени от дадено котило, следва да включват котилото в статистическия модел за предпазване срещу завишен процент грешки от тип I (98)(99)(100)(101). Измервателната единица за целите на статистиката следва да бъде котилото, а не новороденото животно. Експериментите трябва да бъдат планирани по такъв начин, че животните от едно котило да не се третираат като независими наблюдения. Всяка многократно измервана крайна точка в един и същ обект следва да се анализира с използване на статистически модели, които отчитат, че тези измервания не са независими.

#### Доклад от изпитването

50. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

##### *Изпитван химикал:*

- физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;
- данни за идентифициране, включително източник;
- чистота на сместа, както и известни и/или очаквани онечиствания.

##### *Носител (когато се използва такъв):*

- обосновка за избора на носител, когато е различен от вода или физиологичен разтвор.

##### *Изпитвани животни:*

- използвани видове и породи животни, и обосновка, ако са различни от плъхове;
- доставчик на изпитваните животни;
- брой, възраст в началото и пол на животните;
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим, вода и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването.

##### *Условия на изпитване:*

- обосновка за избора на нивото на доза;
- обосновка за пътищата за дозиране и периода от време;
- спецификации на прилаганите дози, включително подробности за разтворителя, обема и физичната форма на прилагания материал;
- подробна информация за това в какъв вид е изпитваният химикал/хранителната смес, постигната концентрация, стабилност и хомогенност на сместа;
- метод, използван за уникалната идентификация на майките и потомството;
- подробно описание на процедурата(ите) за случаен подбор, използвана(и) за определяне на майките за третираните групи, за избор на новородени животни за бракуване, както и за разпределяне на новородени животни по групи за изпитване;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода или при вдишване (ppm) в действителна доза (mg на kg телесно тегло дневно), ако е приложимо;
- условия на средата, в която се провежда изпитването;
- подробности за качеството на храната и водата (напр. течаша, дестилирана);
- дати на началото и приключването на изследването.

*Наблюдения и процедури за изпитване:*

- подробно описание на процедурите, които се използват за стандартизиране на наблюденията и процедурите, както и работни определения при използване на точкови системи за наблюденията;
- списък на всички използвани процедури на изпитване, както и обосновка за тяхното използване;
- подробности за използваните поведенчески/функционални и свързани с патологията, неврохимията или електрофизиологията процедури, включително информация и подробности относно автоматизирани устройства;
- процедури за калибриране и гарантиране на равностойността на устройствата и на балансирането на третираните групи в процедурите за изпитване;
- кратка обосновка, която обяснява всички решения, свързани с професионална преценка.

*Резултати (индивидуални или обобщени, включително средни стойности и дисперсия, когато е уместно):*

- броят на животните в началото на изследването и броят в края на изследването;
- броят на животните и котилата, използвани за всеки метод за изпитване;
- идентификационен номер на всяко животно и котилото, от което идва;
- размер на котилото и средно тегло при раждане по пол;
- телесно тегло и данни за изменението на телесното тегло, включително телесно тегло на майките и потомството при прекратяването;
- данни относно консумацията на храни и, ако е приложимо, относно потреблението на вода (например, ако изпитваният химикал се приема чрез водата);
- данни за отговора във връзка с токсичността, по пол и ниво на доза, включително признаци на токсичност или смъртност, включително време и причина за смъртта, ако е уместно;
- естество, сила, продължителност, ден на поява, по кое време през деня и последващ ход на подробните клинични наблюдения;
- резултати по точкова система за всеки ориентир за развиващия се организъм (тегло, полово съзряване и поведенческа онтогенеза) за всяко време на наблюдение;
- подробности за използваните поведенчески/функционални и свързани с патологията, неврохимията или електрофизиологията констатации по пол, включващи както увеличението, така и намаленията в сравнение с контролите;
- находки при аутопсията;
- тегло на мозъка;
- всякакви диагнози, получени от неврологични признаци и увреждания, включително появили се по естествен път заболявания или състояния;
- изображения на репрезентативни находки;
- изображения с незначително увеличение за установяване на хомоложността на срезове, използвани за морфометрията;
- данни за абсорбцията и метаболизма, включително допълнителни данни от отделно токсикокинетично изследване, ако са налични;
- статистическа обработка на резултатите, включително статистически модели, използвани за анализ на данните и резултатите, независимо дали са значими или не;
- списък на изследователския персонал, включително и професионално обучение.

*Обсъждане на резултатите:*

- информация за доза-отговор, по пол и група;
- връзка на всякакви други токсични ефекти със заключението за невротоксичния потенциал на изпитвания химикал, по пол и група;

- въздействие на всякаква токсикокинетична информация върху заключенията;
- прилики с ефектите от всякакви известни невротоксиканти;
- данни в подкрепа на надеждността и чувствителността на метода за изпитване (т.е. положителни и контролни данни за минали периоди);
- зависимости (ако има такива) между невропатологични и функционални ефекти;
- NOAEL или еталонна доза за майки и потомство, по пол и група.

#### Заключения:

- обсъждане на общото тълкуване на данните въз основа на резултатите, включително заключение дали изпитваният химикал е причинил невротоксичност за развиващия се организъм, и NOAEL.

#### ЛИТЕРАТУРА

- (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. Available: [[http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS\\_Harmonized/870\\_Health\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Series/](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. Available: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recorddisplay.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 № 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Available: [[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 № 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Available: [[http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en\\_2649\\_34377\\_1916054\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](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) Глава Б.34 от настоящото приложение, Изпитване за токсичност за размножаването в едно поколение.
- (15) Глава Б.35 от настоящото приложение, Изпитване за репродуктивна токсичност в две поколения.
- (16) Глава Б.43 от настоящото приложение, Невротоксикологично изследване при гризачи.
- (17) Глава Б.31 от настоящото приложение, Изпитване за оценка на токсичността за пренаталното развитие.
- (18) Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели. ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 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. Available: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- (20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Available: [<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.

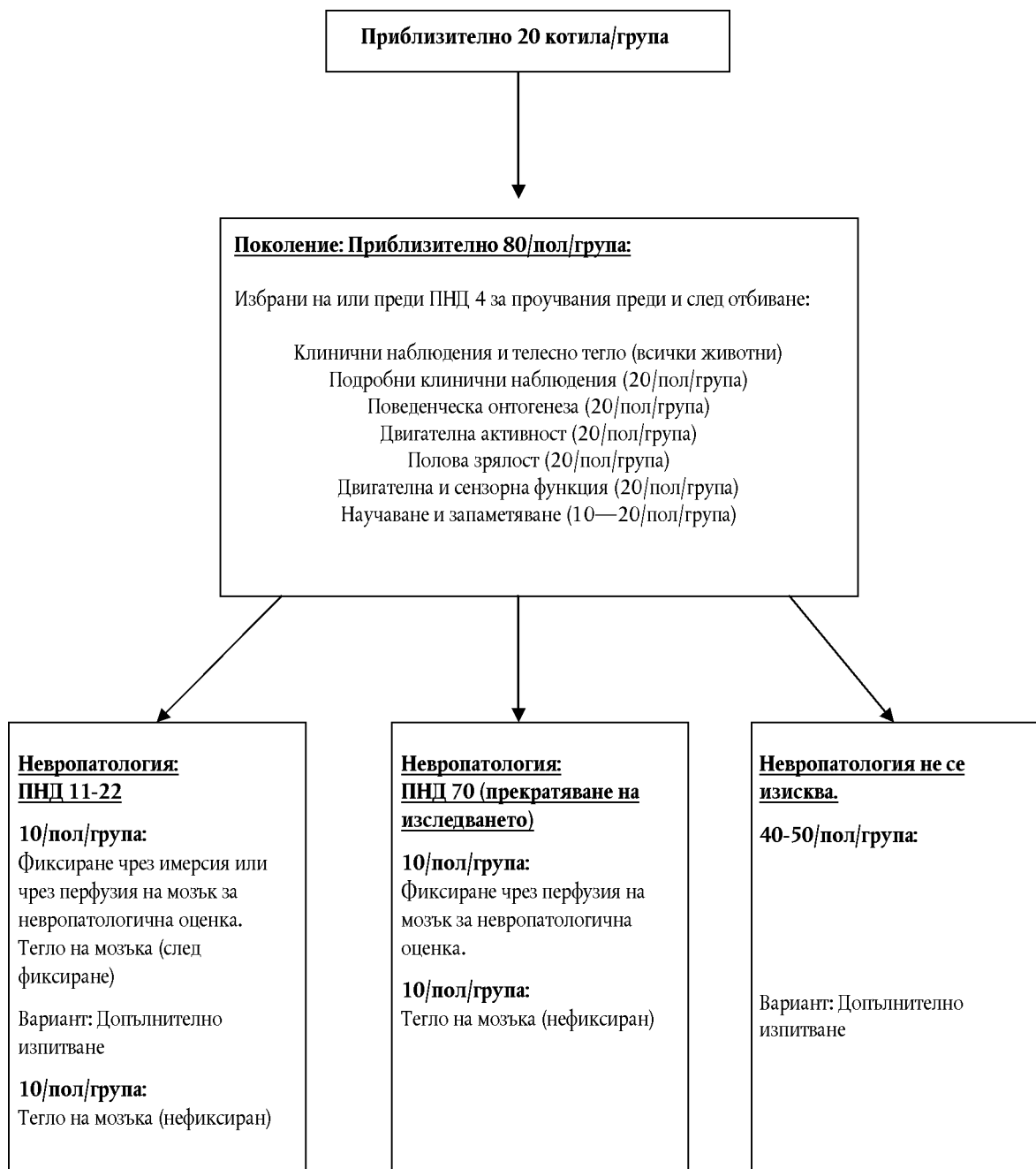
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed 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 neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545-561.
- (76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., 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.

Фигура 1

Обща схема за изпитване за функционални/поведенчески изпитвания, оценка на невропатологията и тегло на мозъка. Тази диаграма се основава на описанието в параграфи 13—15 (ПНД = постнатален ден). Примери за разпределяне на животни са дадени в допълнение 1.



## Допълнение 1

1. Примери за възможни разпределения са описани и представени в табличен вид по-долу. Тези примери са предоставени, за да се илюстрира това, че разпределянето на животни за изследване по различни парадигми за изпитване може да се извърши по няколко различни начина.

## Пример 1

2. Един набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изследване на поведенческата онтогенеза преди отбиване. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват по хуманен начин през ПНД 22. Мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за хистопатологична оценка. Освен това данните за теглото на мозъка се събират, като се използва нефиксиран мозък от оставащите 10 мъжки и 10 женски животни от ниво на доза.
3. Друг набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за функционални/поведенчески изпитвания след отбиване (подробни клинични наблюдения, изпитване на двигателната активност, чрез интензивни слухови стимули, на когнитивната функция при млади животни) и оценка на възрастта на полово съзряване. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се анестезират и се фиксират чрез перфузия при прекратяване на изследването (приблизително през ПНД 70). След допълнителна фиксация *in situ*, мозъкът се отстранява и се обработва за невропатологична оценка.
4. Трети набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изпитване на когнитивната функция при млади полово зрели животни (напр. ПНД 60—70). От тези животни, 10 животни от пол и от група (1 мъжко и 1 женско от котило) се умъртвяват при прекратяване на изследването и мозъкът се отстранява и се претегля.
5. Останалите 20 животни от пол и от група се запазени за евентуални допълнителни изпитвания.

Таблица 1

| Новородено № <sup>(a)</sup> |   | Брой новородени, разпределени за изпитване                                             | Преглед/Изпитване                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------|---|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| м                           | ж |                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                      |
| 1                           | 5 | 20 м + 20 ж<br>10 м + 10 ж<br>10 м + 10 ж                                              | Поведенческа онтогенеза<br>ПНД 22 тегло на мозъка/невропатология/морфометрия<br>ПНД 22 тегло на мозъка                                                                                                                               |
| 2                           | 6 | 20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>10 м + 10 ж | Подробни клинични наблюдения<br>Двигателна активност<br>Полово съзряване<br>Двигателна и сензорна функция<br>Научаване и запаметяване (ПНД 25)<br>Тегло на мозъка/невропатология/морфометрия при млади полово зрели животни ~ ПНД 70 |
| 3                           | 7 | 20 м + 20 ж<br>10 м + 10 ж                                                             | Научаване и запаметяване (млади полово зрели животни)<br>Тегло на мозъка при млади полово зрели животни ~ ПНД 70                                                                                                                     |
| 4                           | 8 | —                                                                                      | Резерв от животни за замяна или за допълнителни изпитвания                                                                                                                                                                           |

<sup>(a)</sup> За този пример животните са бракувани до оставане на 4 мъжки + 4 женски от котило; мъжките новородени са номерирани с номера от 1 до 4, а женските новородени — от 5 до 8.

## Пример 2

6. Един набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изследване на поведенческата онтогенеза преди отбиване. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват по хуманен начин през ПНД 11. Мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за хистопатологична оценка.
7. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза (1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изследвания след отбиване (подробни клинични наблюдения, двигателна активност, оценка на възрастта на полово съзряване и двигателна и сензорна функция). От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се анестезират и се фиксират чрез перфузия при прекратяване на изследването (приблизително през ПНД 70). След допълнителна фиксация *in situ*, мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за невропатологична оценка.
8. 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е., 1 мъжко или 1 женско от котило) се използват за изпитване на когнитивната функция при млади и млади полово зрели животни. При изпитването за когнитивната функция през ПНД 23 и при млади полово зрели животни се използват различни животни. При прекратяването изпитваните като полово зрели 10 животни от пол и от група се умъртвяват, мозъкът се отстранява и се претегля.
9. Оставащите 20 животни от пол и от група, които не са избрани за изпитване, се умъртвяват и отстраняват при отбиването.

Таблица 2

| Новородено № <sup>(a)</sup> |   | Брой новородени, разпределени за изпитване                              | Преглед/Изпитване                                                                                                                                                                               |
|-----------------------------|---|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| м                           | ж |                                                                         |                                                                                                                                                                                                 |
| 1                           | 5 | 20 м + 20 ж<br>10 м + 10 ж                                              | Поведенческа онтогенеза<br>ПНД 11 тегло на мозъка/невропатология/морфометрия                                                                                                                    |
| 2                           | 6 | 20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>10 м + 10 ж | Подробни клинични наблюдения<br>Двигателна активност<br>Полово съзряване<br>Двигателна и сензорна функция<br>Тегло на мозъка/невропатология/морфометрия при млади полово зрели животни ~ ПНД 70 |
| 3                           | 7 | 10 м + 10 ж <sup>(b)</sup>                                              | Научаване и запаметяване (ПНД 23)                                                                                                                                                               |
| 3                           | 7 | 10 м + 10 ж <sup>(b)</sup>                                              | Научаване и запаметяване (млади полово зрели животни)<br>Тегло на мозъка при млади полово зрели животни                                                                                         |
| 4                           | 8 | —                                                                       | Умъртвени и отстранени животни ПНД 21.                                                                                                                                                          |

<sup>(a)</sup> За този пример животните са бракувани до оставане на 4 мъжки + 4 женски от котило; мъжките новородени са номерирани с номера от 1 до 4, а женските новородени — от 5 до 8.

<sup>(b)</sup> Използват се различни новородени за когнитивни изпитвания през ПНД 23 и при млади полово зрели животни (например четни/нечетни котила от общо 20).

## Пример 3

10. Един набор от 20 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за претегляне на мозъка и оценка на невропатологията през ПНД 11. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват по хуманен начин през ПНД 11 и мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за хистопатологична оценка. Освен това данните за теглото на мозъка се събират, като се използва нефиксиран мозък от оставащите 10 мъжки и 10 женски животни от ниво на доза.

11. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза (т.е., 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за поведенческа онтогенеза (двигателна активност), изследвания след отбиване (двигателна активност и оценка на възрастта на полово съзряване) и изпитване на когнитивна функция при млади животни.
12. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза (т.е., 1 мъжко и 1 женско от котило) се използва за изпитване на двигателната и сензорна функция (чрез интензивни слухови стимули) и подробни клинични наблюдения. От тези животни 10 новородени от пол и от ниво на доза (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се анестезират и се фиксират чрез перфузия при прекратяване на изследването (приблизително през ПНД 70). След допълнителна фиксация *in situ*, мозъкът се отстранява, претегля се и се обработва за невропатологична оценка.
13. Друг набор от 20 животни от всеки пол и ниво на доза се използва за изпитване на когнитивната функция при млади полово зрели животни (т.е., 1 мъжко и 1 женско от котило). От тях 10 животни от пол и от група (т.е. 1 мъжко или 1 женско от котило) се умъртвяват при прекратяване на изследването, мозъкът се отстранява и се претегля.

Таблица 3

| Новородено № <sup>(a)</sup> |   | Брой новородени, разпределени за изпитване               | Преглед/Изпитване                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------|---|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| м                           | ж |                                                          |                                                                                                                                                                                                             |
| 1                           | 5 | 10 м + 10 ж<br>10 м + 10 ж                               | ПНД 11 тегло на мозъка/невропатология/морфометрия<br>ПНД 11 тегло на мозъка                                                                                                                                 |
| 2                           | 6 | 20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж<br>20 м + 20 ж | Поведенческа онтогенеза (двигателна активност)<br>Двигателна активност<br>Полово съзряване<br>Научаване и запаметяване (ПНД 27)                                                                             |
| 3                           | 7 | 20 м + 20 ж<br><br>20 м + 20 ж<br>10 м + 10 ж            | Изпитване чрез интензивни слухови стимули (млади животни и млади полово зрели животни)<br>Подробни клинични наблюдения<br>Млади полово зрели животни — тегло на мозъка/невропатология/ морфометрия ~ ПНД 70 |
| 4                           | 8 | 20 м + 20 ж<br>10 м + 10 ж                               | Научаване и запаметяване (млади полово зрели животни)<br>Тегло на мозъка при млади полово зрели животни                                                                                                     |

<sup>(a)</sup> За този пример животните са бракувани до оставане на 4 мъжки + 4 женски от котило; мъжките новородени са номерирани с номера от 1 до 4, а женските новородени — от 5 до 8.

*Допълнение 2***Определения**

Химикал: Вещество или смес

Изпитван химикал: Всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

---

**Б.54. УТЕРОТРОФИЧНО БИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ ПРИ ГРИЗАЧИ: КРАТКОСРОЧНО СКРИНИНГОВО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ЕСТРОГЕННИ СВОЙСТВА****УВОД**

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 440 (2007). През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите указания и по разработване на нови указания за скрининг и изпитвания за потенциални нарушители на функциите на ендокринната система (1). Един от елементите на дейността беше да се разработи указание за изпитване за утеротрофично биологично изследване при гризачи. След това утеротрофичното биологично изследване при гризачи бе предмет на обширна програма за валидиране, включително съставянето на подробен информационен документ (2)(3) и провеждането на обширни вътрешно- и междулабораторни изследвания, за да се покаже уместността и възпроизводимостта на биологичното изследване с мощен референтен естроген, слаби естрогенни рецепторни агонисти и отрицателен референтен химикал (4)(5)(6)(7)(8)(9). Този метод за изпитване Б.54 е резултат от опита, натрупан по време на плана на изпитването за валидиране, и получените по този начин резултати с естрогенни агонисти.
2. Утеротрофичното биологично изследване е краткосрочно скринингово изследване, появило се през 1930-те години (27)(28) и за пръв път стандартизирано за скрининг от комитет от експерти през 1962 г. (32)(35). То се основава на увеличаването на телото на матката или на утеротрофичен отговор (за преглед вж. 29)). С него се оценява способността на даден химикал да проявява биологична активност, съответстваща на агонисти или антагонисти на природни естрогени (напр. 17 $\beta$ -естрадиол), но използването му за откриване на антагонисти е много по-рядко срещано, отколкото за агонисти. Матката отговаря на естрогени по два начина. Първоначален отговор е увеличението на телото в резултат на поглъщане на вода. Този отговор е последван от наддаване на телло в резултат на растеж на тъкан (30). Отговорите на матката при плъхове и при мишки са съпоставими в качествено отношение.
3. Това биологично изследване служи като скринингово изследване *in vivo* и неговото прилагане следва да се разглежда в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (Допълнение 2). В тази концептуална рамка утеротрофичното биологично изследване се съдържа в равнище 3 като изследване *in vivo*, предоставящо данни относно единен ендокринен механизъм, т.е. естрогенност.
4. Утеротрофичното биологично изследване е предназначено да бъде включено в батерия от изпитвания *in vitro* и *in vivo* за установяване на химикали, които имат потенциала да взаимодействат с ендокринната система, които в крайна сметка водят до оценки на риска за човешкото здраве или околната среда. Програмата за валидиране на ОИСП използва както силни, така и слаби естрогенни агонисти, за да направи оценка на пригодността на изследването за идентифициране на естрогенни химикали (4)(5)(6)(7)(8). По този начин, освен добрата вътрешно- и междулабораторна възпроизводимост, беше добре показана чувствителността на изпитвателната процедура за естрогенни агонисти.
5. По отношение на отрицателните химикали, само един „отрицателен“ референтен химикал, който вече беше докладван като отрицателен от утеротрофично изследване, както и от изпитвания *in vitro* на свързването към рецептори и на рецептори, беше включен в програмата за валидиране, но бяха оценени допълнителни изпитвателни данни, които не са свързани с програмата на ОИСП за валидиране, предоставящи допълнителна подкрепа за специфичността на утеротрофичното биологично изследване за скрининг на естрогенни агонисти (16).

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ**

6. Естрогенните агонисти и антагонисти действат като лиганди за естрогенните рецептори  $\alpha$  и  $\beta$  и съответно могат да активират или да потискат транскрипционното действие на рецепторите. Това може да има потенциал да доведе до опасност за здравето, включително до ефекти върху репродукцията и развиващия се организъм. Поради това съществува необходимост от бързо извършване на оценка на даден химикал като възможен естрогенен агонист или антагонист. Макар и даващ информация, афинитетът на даден лиганд към даден естрогенен рецептор или към транскрипционно активиране на репортерни гени *in vitro* е само един от няколко определящи фактори за евентуален риск. Други определящи фактори, зависещи най-малко отчасти от пътя на прилагане и изпитвания химикал, могат да включват метаболитно активиране и деактивиране при влизане в тялото, разпределяне в прицелни тъкани и клирънс от организма. Това води до необходимостта от извършване на скрининг на потенциалното действие на даден химикал *in vivo* при подходящи условия, освен ако характеристиките на химикала по отношение на абсорбция — разпределение — метаболизъм — екскреция (АРМЕ) вече не дават подходяща информация. Отговорът на маточните тъкани на стимулирането с естрогени е бърз и енергичен растеж, особено при лабораторни гризачи, при които еструсът продължава около 4 дни. Различни видове гризачи, особено плъховете, се използват също така широко в изследванията за токсичност за характеризиране на риска. Следователно матката при гризачите е подходящ прицелен орган за скрининг *in vivo* на естрогенни агонисти и антагонисти.
7. Настоящият метод за изпитване се основава на онези протоколи, използвани в изследването на ОИСП за валидиране, които са показали, че са надеждни и възпроизводими във вътрешно- и междулабораторни изследвания (5)(7). Понастоящем на разположение съществуват два метода, а именно метод с овариектомизирани половозрепи женски животни (метод с половозрепи животни) и метод с незрели неовариектомизирани животни (метод с незрели

животни). В програмата на ОИСП за изпитвания за валидиране е било показано, че и двата метода са със сравнима чувствителност и възпроизводимост. Обаче методът с незрели животни, тъй като те имат невредима хипоталамус-хипофиза-гонадна ос (ос ХХГ), е в известен смисъл по-неспецифичен, но покрива по-широк обхват на изследване от метода с полово зрели животни, тъй като може да предизвика отговор на химикали, които взаимодействат с оста ХХГ, а не просто с естрогенния рецептор. Оста ХХГ при плъховете започва да функционира на около 15-дневна възраст. Преди това, пубертетът не може да се ускори с третирания като гонадотропин-освобождаващ хормон (GnRH). Когато женските започнат да достигат пубертет, преди отварянето на вагината, при женското животно ще има няколко скрити цикли, които не водят до отваряне на вагината или овулация, но при които има известни хормонални колебания. Ако даден химикал стимулира оста ХХГ пряко или непряко, в резултат на това се получава преждевременен пубертет, ранна овулация и ускорено отваряне на вагината. Такъв ефект имат не само химикали, които въздействат на оста ХХГ, но и някои хранителни режими с по-високи нива на енергия от обмяна на веществата отколкото други стимулират растежа и ускоряват отварянето на вагината без да са естрогенни. Такива химикали не биха довели до утеротрофичен отговор при овариетомизирани полово зрели животни, тъй като тяхната ос ХХГ не функционира.

8. От съображения за хуманно отношение към животните следва да се отдаде предпочитание на метода с незрели плъхове, като се избягва предварителна хирургична обработка на животните и се избягва и възможно неизползване на онези животни, при които има показания за навлизане в еструс (вж. параграф 30).
9. Утеротрофичният отговор не е изцяло от естрогенен произход, т.е. химикали, различни от агонисти или антагонисти на естрогени, могат също така да предизвикат отговор. Например, сравнително високи дози на прогестерон, тестостерон или различни синтетични прогестини могат да доведат до стимулиращ отговор (30). Всеки отговор може да бъде анализиран хистологично за втвърдяване и вроговяване на вагината (30). Независимо от възможния произход на отговора, положителният резултат от утеротрофичното биологично изследване обикновено следва да води до предприемане на действия за допълнително изясняване. Допълнителни доказателства за естрогенност могат да се получат от изследвания *in vitro*, като например изследвания на свързването към естрогенен рецептор и изследвания на транскрипционно активиране, или от други изследвания *in vivo*, като например изследването на женски животни в пубертет.
10. Като се има предвид, че утеротрофичното биологично изследване служи като скринингово изследване *in vivo*, възприетият подход на валидиране беше в съответствие както със съображенията за хуманно отношение към животните, така и със стратегията за поетапно изпитване. За тази цел усилията бяха насочени към стриктно валидиране на възпроизводимостта и чувствителността по отношение на естрогенността — основен проблем за много химикали — докато малко усилия бяха насочени към компонента антиестрогенност на изследването. Беше изпитан само един антиестроген със силна активност, тъй като броят на химикалите с ясен антиестрогенен профил (който да не е неясен поради някаква естрогенна активност) е много ограничен. По този начин настоящият метод за изпитване е посветен на естрогенния протокол, докато протоколът, описващ антагонистичния режим от изследването, е включен в Ръководство (37). Възпроизводимостта и чувствителността на изследването за химикали с чисто антиестрогенна дейност ще бъдат по-ясно определени по-късно, след като процедурата на изпитване е била рутинно използвана за известно време и са идентифицирани повече химикали с този начин на действие.
11. Възприето е всички процедури, свързани с животни, да съответстват на местните стандарти за грижи за животните; описанията на грижите и третирането, изложени по-долу, представляват минимални стандарти за изпълнение и се заменят от местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (38). По-нататъшни указания за хуманното отношение към животните се дават от ОИСП (25).
12. Както при всички изследвания, при които се използват живи животни, от съществено значение е да се гарантира, че данните са наистина необходими преди началото на изследването. Например две условия, при които данните могат да се изискват, са:
  - висок потенциал за експозиция (равнище 1 от Концептуалната рамка, допълнение 2) или признаци за естрогенност (равнище 2) за проучване дали такива ефекти могат да настъпят *in vivo*;
  - ефекти, показващи естрогенност при изпитвания *in vivo* на равнище 4 или 5 за доказване, че ефектите са били свързани с естрогенен механизъм, който не може да бъде изяснен с помощта на изпитване *in vitro*.
13. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в допълнение 1.

## ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

14. За чувствителността на утеротрофичното биологично изследване се разчита на постановка за изпитване на животни, при която хипоталамус-хипофиза-гонадна ос не е функционална, което води до ниски ендогенни нива на циркулиращ естроген. Това ще осигури ниско изходно телло на матката и максимален обхват на отговор на прилаганите естрогени. Две състояния на чувствителност на естроген на женското животно при гризачите отговарят на това изискване:
- i) незрели женски животни след отбиването и преди пубертета, и
  - ii) млади полово зрели женски животни след овариектомия, с предоставено достатъчно време за регресивно развитие на маточните тъкани.
15. Изпитваният химикал се прилага всекидневно по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране. Постепенни дози от изпитвания химикал се прилагат в най-малко две третиранни групи (вж. параграф 33 за насоки) от опитни животни, като се използва по една доза за група и период на прилагане от три последователни дни за метода с незрели животни и минимален период на прилагане от три последователни дни за метода с полово зрели животни. Животните се подлагат на аутопсия приблизително 24 часа след последната доза. За естрогенни агонисти средната маса на матката на третираните групи животни, свързана с носителя, се оценява за статистически значимо нарастване. Статистически значимото нарастване на средната маса на матката на дадена изпитвана група показва положителен отговор при това биологично изследване.

## ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

**Избор на животински вид**

16. Могат да се използват обичайно използваните лабораторни породи гризачи. Например по време на валидирането са били използвани плъхове от породи Sprague-Dawley и Wistar. Породи, при които за матката е известно или се подозира, че дава по-слаб отговор, не трябва да се използват. Лабораторията следва да демонстрира чувствителността на използваната порода, както е описано в параграфи 26 и 27.
17. Плъхове и мишки се използват редовно за утеротрофично биологично изследване от 1930-те години насам. Изследванията на ОИСР за валидиране са били извършвани само с плъхове въз основа на схващането, че се очаква двата вида да са равностойни и поради това един вид трябва да бъде достатъчен за валидиране в световен мащаб, с оглед икономия на ресурси и запазване на животни. Плъхът е избраният вид при повечето изследвания на токсичността за репродукцията и за развиващия се организъм. Като се има предвид, че съществува обширна база данни за минали периоди за мишки и, във връзка с това, за да се разшири обхватът на утеротрофичното биологично изследване при гризачи така, че като изпитван вид да могат да бъдат използвани мишки, е било проведено ограничено последващо изследване за валидиране върху мишки (16). В съответствие с първоначалното намерение за икономии на ресурси и запазване на животни е избран свързващ подход с ограничен брой изпитвани химикали, участващи лаборатории и без изследване на кодирани проби. Това свързващо изследване за валидиране показва, че в качествено и количествено отношение при утеротрофичното биологично изследване на овариектомизирани млади полово зрели мишки има голямо съответствие между данните, получени при плъхове, и тези, получени при мишки. Когато резултатът от дадено утеротрофично биологично изследване може да бъде предварителен по отношение на дългосрочно изследване, това позволява в двете изследвания да се използват животни от същата порода и източник. Свързващият подход беше ограничен до овариектомизирани мишки и докладът не предоставя набор от устойчиви данни за валидиране на модел с незрели животни, следователно моделът с незрели животни с използване на мишки не се разглежда в обхвата на настоящия метод за изпитване.
18. Следователно в някои случаи могат да бъдат използвани мишки вместо плъхове. За този вид следва да бъде направена обосновка въз основа на токсикологични, фармакокинетични и/или други критерии. За мишки е възможно да са необходими изменения на протокола. Например, консумацията на храна на телесно телло при мишки е по-висока от тази на плъховете и следователно съдържанието на фитоестрогени в храната при мишките следва да бъде по-ниско при мишките, отколкото при плъховете (9)(20)(22).

**Условия на отглеждане и хранене**

19. Всички процедури трябва да са в съответствие с местните стандарти за полагане на грижи за лабораторни животни. Тези описания на грижите и третирането представляват минимални стандарти и се заменят от местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (38). Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C (с приблизително отклонение  $\pm 3$  °C). Относителната влажност следва да бъде най-малко 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 % освен по време на почистване на помещението. Целта следва да бъде относителна влажност 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено. Ежедневната последователност при осветлението трябва да е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина.
20. Лабораторна храна и питейна вода трябва да се предоставят *ad libitum*. Млади полово зрели животни могат да бъдат отглеждани в индивидуални клетки или да се разпределят в група до три животни в клетка. Поради младата възраст на незрелите животни, за тях се препоръчва отглеждане на групи в общи клетки.

21. За високите нива на фитоестрогени в лабораторни храни е известно, че увеличават телното на матката при гризачи в степен, достатъчна, за да попречи на утеротрофичното биологично изследване (13)(14)(15). Високите нива на фитоестрогени и енергия от обмяна на веществата в лабораторни храни могат също така да доведат до ранен пубертет, ако се използват незрели животни. Наличието на фитоестрогени произтича основно от включването на продукти от соя и люцерна в лабораторните храни и е доказано, че концентрациите на фитоестрогени варират от една партида стандартни лабораторни храни към друга (23). Телното тегло е важна променлива, тъй като количеството на консумираната храна е свързано с телно тегло. Следователно действителната доза фитоестрогени, консумирана по същия хранителен режим, може да варира при различните видове и според възрастта (9). При незрели женски плъхове консумацията на храна на телно тегло може да е приблизително два пъти по-висока от тази при овариетомизирани млади полово зрели женски животни. При млади полово зрели мишки консумацията на храна на телно тегло може да е приблизително четири пъти по-висока от тази при овариетомизирани млади полово зрели женски плъхове.
22. Резултатите от утеротрофичното биологично изследване (9)(17)(18)(19) обаче сочат, че ограничени количества на фитоестрогени в хранителния режим са приемливи и не намаляват чувствителността на биологичното изследване. Като насока, равнищата на фитоестрогени в хранителния режим не следва да надвишават 350 µg еквивалент на генистеин на грам лабораторни храни за незрели женски плъхове от породите Sprague Dawley и Wistar (6)(9). Такива хранителни режими също трябва да са подходящи, когато се изпитват овариетомизирани млади полово зрели плъхове, тъй като консумацията на храна на телно тегло е по-малка при младите полово зрели животни в сравнение с незрелите животни. Ако трябва да бъдат използвани овариетомизирани полово зрели мишки или почувствителни към фитоестрогени плъхове, следва да бъде взето предвид пропорционално намаление на нивата на фитоестрогени в хранителния режим (20). Освен това, различията в наличната енергия от обмяната на веществата при различните хранителни режими може да доведе до измествания на началото на пубертета във времето (21)(22).
23. Преди проучването се изисква внимателен подбор на хранителен режим без повишени нива на фитоестрогени (за насоки вж. (6)(9)) или енергия от обмяна на веществата, които могат да доведат до невъзможност за разграничаване на резултатите (15)(17)(19)(22)(36). За гарантиране на правилното изпълнение на използваната от лабораторията система за изпитване, както е посочено в параграфи 26 и 27, е важно да бъде извършена проверка на тези два фактора. Като предпазна мярка в съответствие с добрата лабораторна практика (ДЛП), следва да бъдат вземани представителни проби от всяка партида храни, давани по време на изследването, за евентуален анализ за съдържание на фитоестрогени (напр. в случай на висока стойност на телното на матката в сравнение с контролни данни от предходни периоди, или на неадекватен отговор на референтния естроген, 17α-етинилестрадиол). Като част от проучването трябва да бъдат анализирани аликутни части, или същите да бъдат замразени при температура — 20 °C или по такъв начин, че да се предотврати разлагане на пробата преди анализа.
24. Някои материали за постилане могат да съдържат срещани в природата естрогенни или антиестрогенни химикали (напр. за царевичните кочани е известно, че засягат цикъла при плъхове и изглежда, че имат антиестрогенно действие). Избраният материал за постилане трябва да съдържа минимално ниво на фитоестрогени.

#### Подготовка на животните

25. Опитни животни без видими признаци на заболяване или физически отклонения се разпределят на случаен принцип в контролните и третираните групи. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. Животните трябва да бъдат индивидуално идентифицирани. За предпочитане е незрелите животни да бъдат поставяни в клетки с майки или приемни майки до отбиване по време на аклиматизацията. Периодът на аклиматизация преди началото на изследването следва да е около 5 дни за млади полово зрели животни и за незрели животни, доставени с майки или приемни майки. Ако незряло животно е получено като отбито без майка, може да е необходима по-кратка продължителност на периода на аклиматизация, тъй като дозирането трябва да започне веднага след отбиването (вж. параграф 29).

#### ПРОЦЕДУРА

##### Проверка на пригодността на лабораторията

26. Могат да бъдат използвани два различни варианта за проверка на пригодността на лабораторията:
- Периодична проверка, основаваща се на изследване с положителна контрола и изходна стойност (вж. параграф 27). Поне веднъж на всеки 6 месеца и всеки път, когато има промяна, която може да повлияе на провеждането на изследването (например нова рецептура за хранителния режим, промяна в персонала, отговорен за извършването на дисекцията, промяна на породата на животните или на доставчика и др.), реагирането на системата на изпитване (животински модел) следва да бъде проверено, като се използва подходяща доза (основаваща се на изследването с положителна контрола и изходна стойност, описано в параграф 27) на референтен естроген: 17α-етинилестрадиол (CAS № 57-63-6) (EE).
  - Използване на паралелни контроли чрез включване на група, третирана с подходяща доза от референтен естроген във всяко изследване.

Ако системата не отговаря според очакванията, условията на опита трябва да бъдат проверени и съответно изменени. Препоръчва се дозата от референтния естроген, която ще се използва и при двата подхода, да бъде приблизително ED70—ED80.

27. **Изследване с положителна контрола и изходна стойност** — преди дадена лаборатория да проведе за първи път изследване съгласно настоящия метод за изпитване, пригодността на лабораторията следва да бъде доказана чрез изпитване на реагирането на животинския модел чрез установяване на зависимостта доза-отговор по отношение на референтен естроген: 17 $\alpha$ -етинилестрадиол (CAS № 57-63-6) (EE) с най-малко четири дози. Отговорът, изразяващ се в теглото на матката, ще бъде сравнен с установените данни за минали периоди (вж. позоваване (5)). Ако това изследване с положителна контрола и изходна стойност не даде очакваните резултати, условията на опита трябва да бъдат проверени и изменени.

#### Брой и състояние на животните

28. Всяка третирана и всяка контролна група трябва да включва поне 6 животни (за протоколи от методите с незрели и с овариектомизирани полово зрели животни).

#### Възраст на незрелите животни

29. За утеротрофичното биологично изследване с незрели животни следва да бъде определен денят на раждане. Дозирането трябва да започне достатъчно рано, за да се гарантира, че в края на прилагането на изпитвания химикал физиологичното увеличение на ендогенните естрогени, свързано с пубертета, все още не е настъпило. От друга страна, съществуват доказателства, че много младите животни могат да бъдат по-малко чувствителни. За определяне на оптималната възраст всяка лаборатория трябва да вземе предвид свои собствени съпътстващи данни относно съзряването.

Като обща насока, дозирането при плъховете може да започне незабавно след ранното отбиване през постнатален ден 18 (като денят на раждането се счита за постнатален ден 0). За предпочитане е дозирането при плъхове да бъде приключено през постнатален ден 21 и във всички случаи преди постнатален ден 25, тъй като след тази възраст хипоталамус-хипофиза-гонадната ос започва да функционира и нивата на ендогенния естроген може да започнат да нарастват със съпътстващо увеличение на средните стойности на теглото на матката и увеличение на стандартните отклонения за групата (2)(3)(10)(11)(12).

#### Процедура за овариектомия

30. При овариектомизирани женски плъхове и мишки (третиран и контролни групи) овариектомията трябва да се извърши във възраст между 6 и 8 седмици. За плъхове трябва да изминат минимум 14 дни между овариектомията и първия ден на прилагането, за да се даде възможност на матката да достигне стабилно минимално изходно тегло. За мишки трябва да изминат минимум 7 дни между овариектомията и първия ден на прилагането. Тъй като малки количества овариална тъкан са достатъчни за производството на значителни нива на циркулиращи естрогени (3), животните трябва да бъдат изпитани, преди да бъдат използвани, чрез наблюдение на епителни клетки, взети с тампон от влагалището, в продължение най-малко на пет последователни дни (напр. дни 10—14 след овариектомията при плъхове). Ако при животните има показания за навлизане в еструс, животните не трябва да се използват. По-нататък, по време на аутопсията, местата на срезове на яйчниците следва да бъдат изследвани за наличие на овариална тъкан. При наличие, животното не трябва да се използва при изчисленията (3).
31. Процедурата по овариектомия започва с животното, лежащо по корем, след като е било правилно анестезирано. Инцизията за отваряне на задностраничната коремна стена следва да бъде с дължина приблизително 1 cm надлъжно по средата между долния ръб на ребрата и хълбочния гребен, и няколко милиметра странично от страничния ръб на поясния мускул. Яйчникът трябва да се извади от коремната кухина върху асептично поле. Яйчникът следва да бъде отстранен при свързването на яйцепровода с тялото на матката. След потвърждаване, че не се наблюдава силно кръвотечение, коремната стена трябва да бъде затворена с хирургичен шев и кожата трябва да бъде затворена с автоматични скоби (autoclips) или подходящ хирургичен шев. Точките на лигатурата са представени схематично на фигура 1. Следва да се използва подходящо постоперативно обезболяване, както е препоръчано от ветеринар с опит при грижите за гризачи.

#### Телесно тегло

32. При метода с овариектомизирани полово зрели животни телесното тегло и теглото на матката не са взаимосвързани, тъй като теглото на матката се влияе от хормони като естрогените, но не и от фактори на растежа, които регулират размерите на тялото. Обратно, при модела с незрели животни телесното тегло е свързано с теглото на матката, докато животното съзрява (34). Следователно в началото на изследването вариациите в теглото на животните, използвани при модела с незрели животни, следва да са минимални и да не превишават  $\pm 20\%$  от средното тегло. Това означава, че големината на котилото следва да бъде стандартизирана от снабдителя, за да се гарантира,

че поколението от различни майки ще бъде хранено приблизително по еднакъв начин. Животните трябва да бъдат разпределени към групи (както контролни, така и третиранни) чрез случайно разпределение по телно, така че средното телно телно във всяка група да не е статистически различно от това в която и да е друга група. Следва да се обърне внимание, за да се избегне разпределяне на животни от едно котило към същата третирана група, доколкото това е практически възможно, без да се увеличава броят на котилата, които да се използват за проучването.

### Дозирание

33. С цел да се установи дали даден изпитван химикал може да има естрогенно действие *in vivo*, обичайно са достатъчни две групи с определена доза и една контролна и затова тази постановка е предпочитана от съображения за хуманно отношение към животните. Ако целта е да се получи крива доза-отговор или да се екстраполира към по-ниски дози, необходими са най-малко 3 групи с определена доза. Ако се изисква информация извън тази за естрогенната активност (като например оценка на ефикасността), трябва да бъде взета под внимание отделна схема на дозирание. С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролната група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този при животните от изпитваната група. Ако се използва носител при прилагането на изпитвания химикал, контролната група трябва да получава същото количество носител, което се използва при третираните групи (или най-високият обем, използван при третираните групи, ако обемът е различен при различните групи).
34. Целта в случая на утеротрофичното биологично изследване е да се изберат дози, които гарантират оцеляването на животните, и които са без значителна токсичност или дистрес за животните след три последователни дни на прилагане на химикала до максимална доза от 1 000 mg/kg/ден. Всички нива на доза следва да се предлагат и подбират, като се имат предвид всички достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него материали. За най-високото ниво на доза следва първо да се вземе под внимание стойността на LD50 и/или информацията за остра токсичност с цел да се избегне смърт, силно страдание или дистрес при животните (24)(25)(26). Най-високата доза следва да представлява максималната допустима доза (МДП); изследване, проведено при ниво на доза, предизвикало положителен утеротрофичен отговор, също би било прието. Като скрининг, големи интервали (напр. половин логаритмична единица, отговаряща на кратност на дозата, равна на 3,2, или дори до една логаритмична единица) между дозиранията са общоприемливи. Ако няма достъпни подходящи данни, може да се проведе изследване за определяне на обхвата, което да подпомогне определянето на използваните дози.
35. Като алтернатива, ако естрогенната ефикасност на даден агонист може да бъде оценена от данни *in vitro* (или *in silico*), тези данни могат да бъдат взети под внимание при избора на доза. Например, количеството на изпитвания химикал, който би произвел утеротрофичен отговор, който да е равностоеен на референтния агонист (етинилестрадиол) се оценява по неговата относителна ефикасност *in vitro* по отношение на етинилестрадиол. Най-високата доза на изпитване ще бъде приложена като кратна на тази равностойна доза с кратност напр. 10 или 100.

### Съображения при определянето на обхвата

36. Ако е необходимо, може да се извърши предварително изследване за определяне на обхвата, с малко на брой животни. В това отношение, Ръководство на ОИСП № 19 (25) може да се използва за определяне на клиничните признаци, които показват токсичност или дистрес за животните. Ако е осъществимо в рамките на това изследване за определяне на обхвата след три дни от прилагането, матките могат да бъдат изрязани и претеглени приблизително 24 часа след последната доза. Тези данни биха могли да се използват след това за подпомагане при планирането на основното изследване (за избор на приемлива максимална и по-ниски дози, и за препоръка относно броя на групите с определена доза).

### Прилагане на дозите

37. Изпитваният химикал се прилага по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране. При избора на пътя на прилагане следва да бъдат взети под внимание съображенията за хуманно отношение към животните, както и токсикологичните аспекти, като например относимост към пътя на експозиция на химикала при хора (напр. относимост на орален път през сонда към експозиция чрез поглъщане, или на подкожно инжектиране към вдишване или към дермална адсорбция), физичните/химични свойства на изпитвания материал и особено съществуващата токсикологична информация и данни за метаболизма и кинетиката (напр. необходимост да се избегне ефектът на първото преминаване, по-добра ефикасност чрез конкретен път).
38. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтвор/суспензия. Но тъй като повечето естрогенни лиганди или техните метаболитни прекурсори са хидрофобни, най-често използваният подход е използване на разтвор/суспензия в масло (напр. царевично, фъстъчено, сусамово или маслиново масло). Тези масла обаче имат различно съдържание на калории и на мазнини, като с това носителът може да засегне общия прием на енергия от обмяната на веществата, като по този начин потенциално се променят измерените крайни точки, като телното на матката, особено при метода с незрели животни (33). Затова, преди изследването всеки носител, който ще бъде използван, следва да се изпита върху контроли без носители. Изпитваните химикали могат да бъдат разтворени в минимално количество 95 % етанол или други подходящи разтворители, и разредени до окончателните работни концентрации в изпитвания носител. Токсичните характеристики на

разтворителя трябва да бъдат известни и следва да се изпитат в отделна контролна група само на разтворител. Ако изпитваният химикал се счита за стабилен, може да се използва слабо нагряване и енергично механично действие за подпомагане на разтварянето на изпитвания химикал. Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носителя. Ако изпитваният химикал е стабилен за периода на изследването, тогава може да бъде приготвена една начална аликвотна част от изпитвания химикал, и определените разреждания на дозата да се приготвят всеки ден.

39. Графикът за дозиране ще зависи от използвания модел (вж. параграф 29 за модела с незрели животни и параграф 30 за модела с овариетомизирани половозреели животни). Незрелите женски плъхове се дозират с изпитвания химикал ежедневно в продължение на три последователни дни. Триденно третиране се препоръчва и за овариетомизирани женски плъхове, но по-продължителната експозиция е приемлива и може да доведе до подобро откриване на слабо активни химикали. При овариетомизирани женски мишки продължителност на прилагане от 3 дни следва да е достатъчна, без да има значително предимство при удължаване на срока до седем дни за силни естрогенни агонисти, но тази връзка не е доказана за слаби естрогени в изследването за валидиране (16) и следователно дозирането при овариетомизирани половозреели мишки следва да бъде удължено до 7 последователни дни. Дозата следва да се дава по едно и също време всеки ден. Те трябва да бъдат коригирани, колкото е необходимо, за да се поддържа постоянно ниво на доза на телесно тегло на животното (напр. mg изпитван химикал на kg телесно тегло на ден). По отношение на изпитвания обем, неговото вариране на основа телесно тегло следва да се сведе до минимум чрез регулиране на концентрацията на дозирания разтвор с цел да се осигури постоянен обем на основа телесно тегло на всички нива на доза и за всеки път на прилагане.
40. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранене през сонда, това следва да става чрез еднократна дневна доза за животното през стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Следва да се спазват местните насоки за грижи за животните, но обемът не следва да превишава 5 ml/kg телесно тегло, освен в случай на водни разтвори, където могат да бъдат използвани 10 ml/kg телесно тегло.
41. Когато изпитваният химикал се прилага чрез подкожно инжектиране, това следва да се прави с една дневна доза. В дорзално-скапуларната или поясната област дозите трябва да се прилагат посредством стерилна игла (напр. 23G или 25G) и туберкулинова спринцовка. Бръсненето на мястото на инжектиране е по избор. Всякакви загуби, изтичане на мястото на инжектиране или непълно дозиране трябва да бъдат записвани. Общото количество инжектиран обем на плъх на ден не трябва да надхвърля 5 ml/kg телесно тегло, разделени на 2 места на инжектиране, освен в случаите, когато се прилагат водни разтвори, при които могат да бъдат използвани 10 ml на kg телесно тегло.

## Наблюдения

### Общи и клинични наблюдения

42. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно и по-често, когато се наблюдават признаци на токсичност. Наблюденията следва да се извършват за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид върховият период на предвидените ефекти след получаване на дозата. Всички животни следва да бъдат наблюдавани за смъртност, заболяемост и общи клинични признаци като промяна в поведението, кожата, козината, очите, мукозните мембрани, поява на секречия и екскречия, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане).

### Телесно тегло и консумация на храна

43. Всички животни трябва да бъдат претегляни дневно с точност до 0,1 g, като се започне точно преди започване на третирането, т.е., когато животните се разпределят на групи. Като незабавително измерване, количеството на консумираната храна през периода на третиране може да бъде измерено за отделната клетка чрез претегляне на хранилката. Резултатите за консумацията на храна следва да бъдат изразени в грамове на плъх дневно.

### Дисекция и измерване на теглото на матката

44. Двадесет и четири часа след последното третиране плъховете се умишлено убиват по хуманен начин. В идеалния случай аутопсията се извършва на случаен принцип между различните групи, за да се избегне поставянето на дадена група на първо или последно място, което може леко да повлияе на данните. Целта на биологичното изследване е да се измери теглото на матката както в мокро състояние, така и след изсушаване. Мокрото тегло включва матката и съдържанието на луминална течност. Теглото след изсушаване се изчислява след като съдържанието луминална течност в матката бъде изразено и отстранено.

45. Преди дисекцията при незрели животни се преглежда състоянието на отвора на вагината. Процедурата по дисекцията започва с отварянето на коремната стена, като се започне при лонното съчленение. След това рогът на матката и яйчниците, ако са налични, се отделят от дорзалната коремна стена. Пикочният мехур и уретерите се отстраняват от вентралната и страничната страна на матката и влагалището. Влакнестите сраствания между ректума и влагалището се отделят, докато бъде идентифицирана точката на свързване на отвора на влагалището и кожата на перинеума. Матката и влагалището се отделят от тялото чрез инцизия на стената на влагалището малко над точката на свързване с кожата на перинеума, както е показано на фигура 2. Матката следва да бъде отделена от тялото чрез леко срязване на маточния мезентерий в мястото на закрепване по цялата дължина на дорзолатералния аспект на всеки рог на матката. След като матката бъде извадена от тялото, нейната обработка трябва да бъде достатъчно бърза, за да се избегне изсушаване на тъканите. Загубата на тепло поради изсушаване става по-значима при малки тъкани като матката (23). Ако яйчниците са налични, те се отстраняват при яйцепровода, като се избягва загубата на луминална течност от рога на матката. Ако животното е било овариетомизирано, местата на срезове следва да бъдат изследвани за наличие на овариална тъкан. Излишната мазнина и съединителна тъкан трябва да се почисти. Влагалището се отстранява от матката точно под шийката на матката, така че шийката на матката остава с тялото на матката, както е показано на фигура 2.
46. Всяка матка следва да бъде прехвърлена в индивидуално маркиран и претеглен съд (напр. блюдо „Петри“ или пластмасово тегловно блюдо) внимателно, за да се избегне изсушаване преди претеглянето (напр. в контейнера може да бъде поставена филтърна хартия, леко напоена с физиологичен разтвор). Матката с луминалната течност се претегля с точност до 0,1 mg (мокро тепло на матката).
47. След това всяка матка се обработва индивидуално за отстраняване на луминалната течност. И двата рога на матката се пробиват или срязват надлъжно. Матката се поставя върху леко овлажнена филтърна хартия (например Уотман № 3) и леко се притиска с втора леко овлажнена филтърна хартия за цялостно премахване на луминалната течност. Матката без луминалната течност се претегля с точност до 0,1 mg (тепло на матката в изсушено състояние).
48. Теглото на матката при прекратяване може да бъде използвано, за да се гарантира, че не е била превишена подходящата възраст на невредимия незрял плъх, но въпреки това данните от минали периоди за породата плъхове, използвана от лабораторията, са от решаващо значение в това отношение (вж. параграф 56 за тълкуване на резултатите).

#### *Незадължителни изследвания*

49. След претеглянето матката може да се фиксира в 10 % неутрален буфериран формалинов разтвор, за хистопатологично изследване след оцветяване с хематоксилин и еозин. Влагалището може да бъде съответно изследвано (вж. параграф 9). В допълнение може да бъде направено морфометрично измерване на ендометриалния епител за количествено сравнение.

#### ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ

##### **Данни**

50. Данните от изследването следва да включват:
- броя на животните в началото на изпитването,
  - броя и идентичността на намерените мъртви животни по време на изследването или умъртвени по хуманни съображения, както и датата и часа на всяка смърт или умъртвяване на животните по хуманен начин,
  - броя и идентичността на животните, показващи признаци на токсичност, и описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително времето им на настъпване, продължителността и силата на всички токсични ефекти, и
  - броя и идентичността на животните, които показват всякакви увреждания, и описание на типа на уврежданията.
51. Индивидуалните данни за животните следва да се регистрират за телесното тепло, мокрото тепло на матката и теглото на матката в изсушено състояние. Следва да се използват статистически анализи с едностранна критична област за агонисти, за да се определи дали прилагането на изпитван химикал е довело до статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличаване на теглото на матката. Следва да се извършат подходящи статистически анализи, за да се изследват свързаните с третирането изменения в теглото на матката в изсушено състояние и в мокрото тепло на матката. Например, данните могат да бъдат оценени чрез подход с ковариационен анализ (ANCOVA) с телесното тепло при аутопсия като ковариант. Преди анализа на данните, върху данните за матката може да бъде направена логаритмична трансформация за стабилизиране на дисперсията. Изпитването на Dunnett и Hsu е подходящо за сравнения по двойки на групите с определена доза с контролите на носител, и за изчисляване на доверителни

интервали. Графики на стандартизирани остатъци могат да се използват за откриване на евентуални стойности, силно различаващи се от нормалните, и за оценка на хомогенността на дисперсиите. Тези процедури бяха приложени в програмата на ОИСП за валидиране, с използване на PROC GLM в SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, Cary, NC), версия 8 (6)(7).

52. Заключениеният доклад включва:

*Извършваща изпитвания лаборатория:*

- Отговорен персонал и неговите отговорности, свързани с обучението
- Данни от изпитването с положителна контрола и референтна стойност и периодични данни от положителни контроли (вж. параграфи 26 и 27)

*Изпитван химикал:*

- Характеризиране на изпитваните химикали
- Физична природа и, където е отнормо, физични и химични свойства
- Метод и честота на изготвяне на разрежданията
- Всички събрани данни за стабилност
- Всички анализи на разтворите за дозиране

*Носител:*

- Характеризиране на изпитвания носител (естество, доставчик и партида)
- Обосновка за избора на носител (когато носителът е различен от вода).

*Изпитвани животни:*

- Вид и порода и обосновка за техния избор
- Доставчик и специални съоръжения на доставчика
- Възраст при доставката, с дата на раждане
- За незрели животни — дали е доставено с майка или приемна майка, и дата на отбиване
- Подробни данни за процедурата за аклиматизация на животното
- Брой животни в клетка
- Подробности и метод за индивидуална и групов идентификация на животните

*Условия на изследването:*

- Подробности относно процеса на случаен подбор (т.е. използван метод)
- Обосновка на избора на доза;
- Подробности за това в какъв вид е изпитваният химикал и какви са достигнатите концентрации, стабилност и хомогенност на този химикал
- Подробности за прилагането на изпитвания химикал и обосновка за избора на път на експозиция
- Хранителен режим (наименование, вид, доставчик, съдържание и, ако са известни, нива на фитоестрогени)
- Източник на вода (напр. чешмяна вода или филтрувана вода) и доставка (чрез тръби от голям контейнер, в бутилки и т.н.)
- Материал за постилане (наименование, вид, доставчик, съдържание)
- Регистриране на условията за поставяне в клетки, интервала на осветление, температурата и влажността в помещението, почистването на помещението
- Подробно описание на аутопсията и процедурите за претегляне на матката
- Описание на статистическите процедури

*Резултати**За отделните животни:*

- Всички дневни индивидуални телесни тегла (от разпределението по групи до аутопсията) (с точност до 0,1 g)
- Възраст на всяко животно (в дни, като денят на раждане се счита за ден 0), на която започва прилагането на изпитвания химикал
- Дата и час на прилагане на всяка доза
- Изчислен обем и приложена доза и наблюдения относно всякакви загуби по време на прилагането или след него
- Ежедневно регистриране на състоянието на животното, включително относимите симптоми и наблюдения
- Предполагаема причина за смъртта (ако по време на изследването е намерено в терминално състояние или мъртво)
- Дата и час на умъртвяването по хуманен начин с интервал от време от последното прилагане на доза
- Мокро тегло на матката (с точност до 0,1 mg) и всякакви наблюдения относно загуба на луминална течност по време на дисекцията и подготовката за претегляне
- Тегло на матката в изсушено състояние (с точност до 0,1 mg)

*За всяка група животни:*

- Средно дневно телесно тегло (с точност до 0,1 g) и стандартни отклонения (от разпределението по групи до аутопсията)
- Средни тегла на матката в мокро и изсушено състояние (с точност до 0,1 mg) и стандартни отклонения
- Дневна консумация на храна, ако е измерена (изчислена в грамове консумирана храна на животно)
- Резултатите от статистическите анализи, сравняващи теглата на матката при третираните групи както в мокро, така и в изсушено състояние, спрямо същите измервания в контролните групи на носител.
- Резултатите от статистическите анализи, сравняващи общото телесно тегло и наддаването на тегло при третираните групи спрямо същите измервания в контролните групи на носител.

## 53. Обобщение на важните насочващи факти от метода за изпитване

|                                             | Плъхове                                                                                                                                                           | Мишки |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Животни                                     |                                                                                                                                                                   |       |
| Порода                                      | Обичайно използвана лабораторна порода гризачи                                                                                                                    |       |
| Брой животни                                | Най-малко 6 животни в група с определена доза                                                                                                                     |       |
| Брой на групите                             | Най-малко 2 групи за изпитване (вж. параграф 33 за насоки) и отрицателна контролна група<br>За насоки относно положителните контролни групи вж. параграфи 26 и 27 |       |
| Условия на отглеждане и хранене             |                                                                                                                                                                   |       |
| Т° в помещението с животните                | 22 °C ± 3 °C                                                                                                                                                      |       |
| Относителна влажност                        | 50—60 %, но не под 30 % или над 70 %                                                                                                                              |       |
| Ежедневна последователност при осветлението | 12 часа светлина, 12 часа тъмнина                                                                                                                                 |       |
| Хранителен режим и питейна вода             | Ad libitum                                                                                                                                                        |       |

|                                                       | Плъхове                                                                                                                                | Мишки                                                                            |
|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Отглеждане                                            | Индивидуално или в група до три животни (за незрелите животни се препоръчва отглеждане на групи в общи клетки)                         |                                                                                  |
| Хранителен режим и материал за постилане              | Препоръчва се ниско ниво на фитоестрогени в хранителния режим и материала за постилане                                                 |                                                                                  |
| Протокол                                              |                                                                                                                                        |                                                                                  |
| Метод                                                 | Метод с незрели неовариетомизирани животни (предпочитаният метод).<br>Метод с овариетомизирани половозрели женски животни              | Метод с овариетомизирани половозрели женски животни                              |
| Възраст при дозиране на незрелите животни             | ПНД 18 най-рано. Дозирането трябва да бъде приключено преди ПНД 25                                                                     | Не е относимо в рамките на обхвата на настоящия метод за изпитване.              |
| Възраст при овариетомията                             | Възраст между 6 и 8 седмици.                                                                                                           |                                                                                  |
| Възраст при дозирането за овариетомизирани животни    | Най-малко 14 дни следва да са изтекли от овариетомията до 1-я ден от прилагането.                                                      | Най-малко 7 дни следва да са изтекли от овариетомията до 1-я ден от прилагането. |
| Телесно тегло                                         | Варирането на телесното тегло следва да бъде минимално и да не превишава ± 20 % от средното тегло.                                     |                                                                                  |
| Дозиране                                              |                                                                                                                                        |                                                                                  |
| Път на прилагане                                      | Орален път през сонда или подкожно инжектиране                                                                                         |                                                                                  |
| Честота на прилагане                                  | Еднократна дневна доза                                                                                                                 |                                                                                  |
| Обем за прилагане през сонда или подкожно инжектиране | ≤ 5ml/kg телесно тегло (или до 10 ml/kg телесно тегло в случай на водни разтвори) (на 2 места на инжектиране при подкожно инжектиране) |                                                                                  |
| Продължителност на прилагането                        | 3 последователни дни при модела с незрели животни<br>Най-малко 3 последователни дни при модела с овариетомизирани животни              | 7 последователни дни при модела с овариетомизирани животни                       |
| Час на аутопсията                                     | Около 24 часа след последната доза                                                                                                     |                                                                                  |
| Резултати                                             |                                                                                                                                        |                                                                                  |
| Положителен отговор                                   | Статистически значимо нарастване на средното тегло на матката (в мокро и/или изсушено състояние)                                       |                                                                                  |
| Референтен естроген                                   | 17α-етинилестрадиол                                                                                                                    |                                                                                  |

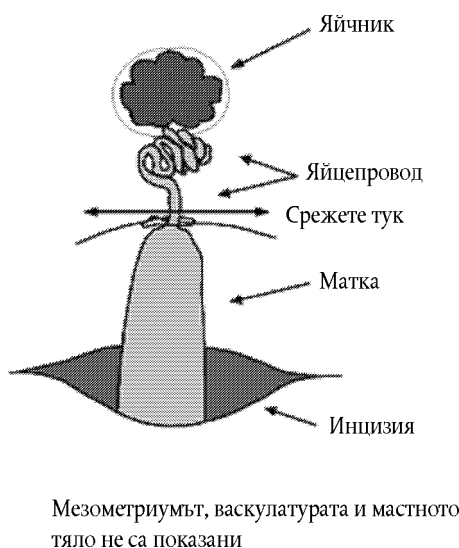
## НАСОКИ ЗА ТЪЛКУВАНЕТО И ПРИЕМАНЕТО НА РЕЗУЛТАТИТЕ

54. По принцип изпитването за естрогенност следва да се счита за положително, ако се наблюдава статистически значимо увеличаване на теглото на матката ( $p < 0,05$ ) най-малко при високото ниво на доза в сравнение с контролната група на разтворител. Положителният резултат се подкрепя допълнително от доказване на биологически реалистична връзка между дозата и степента на отговора, като се има предвид, че припокриването на естрогенната и антиестрогенната активност на изпитвания химикал могат да повлияят на формата на кривата доза-отговор.
55. Трябва да се вземат мерки, за да не се превишава максималната допустима доза, за да се даде възможност за съдържателно тълкуване на данните. Намалването на телесното тегло, клиничните признаци и други находки следва да бъдат подробно оценени в това отношение.

56. Важно съображение за приемането на данните от утеротрофичното биологично изследване са теллата на матката на животните от контролната група на носител. Високите контролни стойности могат да поставят под съмнение реакцирането на биологичното изследване и способността да открива много слаби естрогенни агонисти. Прегледът на специализираната литература и данните, получени по време на валидирането на утеротрофичното биологично изследване, насочват, че случаи на високи средни контролни стойности се появяват спонтанно, особено при незрели животни (2)(3)(6)(9). Категорична горна граница за теллото на матката не може да бъде дадена, тъй като теллото на матката при незрели плъхове зависи от много променливи, като например породата или телесното телло. Като насока, ако теллото на матката при контролни незрели плъхове е между 40 и 45 mg, резултатите следва да се считат за съмнителни, а телло на матката над 45 mg може да доведе до повторно независимо провеждане на изпитването. Това обаче трябва да се разглежда за всеки отделен случай (3)(6)(8). При изпитвания върху възрастни плъхове при всяка непълна овариектомия остава овариална тъкан, която може да произвежда ендогенен естроген и да забави намаляването на теллото на матката.
57. Телло на матката в изсушено състояние при контроли на носител от под 0,09 % от телесното телло за незрели женски плъхове и от по-малко от 0,04 % за овариектомизирани млади полово зрели женски животни изглежда дава приемливи резултати [вж. таблица 31 (2)]. Ако контролните телла на матката са по-големи от тези стойности, трябва да се проучат внимателно различни фактори, включително възрастта на животните, правилната овариектомия, фитоестрогените в хранителния режим и т.н., и евентуален отрицателен резултат от изследването (липса на показания за естрогенна активност) трябва да се използва предпазливо.
58. Данните за минали периоди за контролните групи на носител следва да бъдат запазени в лабораторията. Данните за минали периоди за отговор на положителни референтни естрогени, като 17 $\alpha$ -етинилестрадиол, също следва да бъдат запазени в лабораторията. Лабораториите могат също да изпитват отговора на известни слаби естрогенни агонисти. Всички тези данни могат да бъдат сравнявани с наличните данни (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), за да се гарантира, че методите на лабораторията притежават достатъчна чувствителност.
59. Теллата на матката в изсушено състояние са показали по-малко вариране от тези в мокро състояние в хода изследването на ОИСП за валидиране (6)(7). Независимо от това, значителен отговор в което и да е от тези две измервания е показание, че изпитваният химикал има положителна естрогенна активност.
60. Произходът на утеротрофичния отговор не е изцяло естрогенен, обаче положителният резултат при утеротрофичното биологично изследване по принцип следва да се тълкува като доказателство за естрогенен потенциал *in vivo* и обичайно следва да води до предприемане на действия за допълнително изясняване (вж. параграф 9 и „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (допълнение 2).

Фигура 1

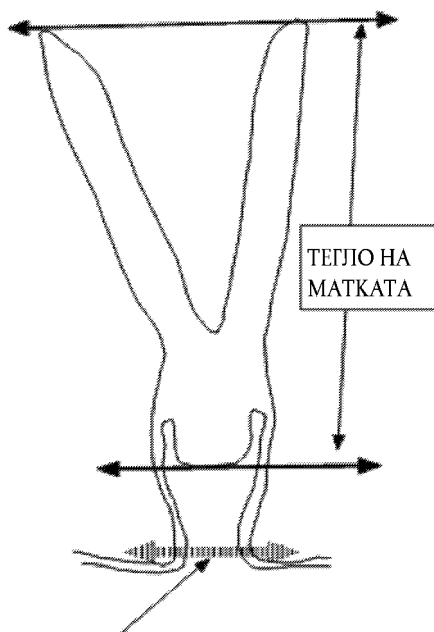
Схематична диаграма, показваща хирургично отстраняване на яйчниците



Процедурата започва с отваряне на задностранната коремна стена по средата между долния ръб на ребрата и хълбочния гребен, и няколко милиметра странично от страничния ръб на поясния мускул. Яйчниците следва да бъдат локализиран в рамките на коремната кухина. След това яйчниците се отделят физически от коремната кухина върху асептично поле, поставя се лигатура между яйчника и матката за овладяване на кръвенето и яйчникът

се отстранява чрез инцизия над лигатурата при свързването на яйцепровода с всеки рог на матката. След потвърждаване, че не се запазва значително кръвотечение, коремната стена трябва да бъде затворена с хирургичен шев и кожата трябва да бъде затворена, например с автоматични скоби (autoclips) или хирургичен шев. На животните следва да се даде възможност да се възстановят и телото на матката да намалее през период най-малко 14 дни преди използването.

Фигура 2

**Отстраняване и подготовка на маточните тъкани за измерване на телото**

Линия на прекъсване при аутопсия

Процедурата започва с отварянето на коремната стена при лонното съчленение. След това всеки яйчник, ако е наличен, и рогът на матката, се отделят от дорзалната коремна стена. Пикочният мехур и уретерите се отстраняват от вентралната и страничната страна на матката и влагалището. Влакнестите сраствания между ректума и влагалището се отделят, докато бъде идентифицирана точката на свързване на отвора на влагалището и кожата на перинеума. Матката и влагалището се отделят от тялото чрез инцизия на стената на влагалището малко над точката на свързване с кожата на перинеума, както е показано на фигурата. Матката следва да бъде отделена от тялото чрез леко срязване на маточния мезентерий в мястото на закрепване по цялата дължина на дорзолатералния аспект на всеки рог на матката. След отстраняването от тялото излишната мазнина и съединителна тъкан се почистват. Ако яйчниците са налични, те се отстраняват при яйцепровода, като се избягва загубата на луминална течност от рога на матката. Ако животното е било овариетомизирано, местата на срезовете следва да бъдат изследвани за наличие на овариална тъкан. Влагалището се отстранява от матката точно под шийката на матката, така че шийката на матката остава с тялото на матката, както е показано на фигурата. След това матката може да бъде претеглена.

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Антиестрогенност** е способността на даден химикал да потиска активността на 17 $\beta$ -естрадиол в организъм на бозайник.

**Химикал** означава вещество или смес.

**Дата на раждане** е постнатален ден 0.

**Дозиране** е общо понятие, включващо дозата и честотата и продължителността на нейния прием.

**Доза** е прилаганото количество от изпитвания химикал. При утеротрофичното биологично изследване дозата се изразява като маса на изпитвания химикал за единица телесно тегло на изпитваното животно на ден (напр. mg на kg телесно тегло дневно).

**Максимална допустима доза (МДД)** е най-голямото количество от даден химикал, което, при въвеждане в тялото, не умъртвява изпитваните животни (обозначава се с LD<sub>0</sub>) (IUPAC, 1993)

**Естрогенност** е способността на даден химикал да действа като 17 $\beta$ -естрадиол в организъм на бозайник.

**Постнатален ден X** е X-тият поред ден на живот след датата на раждане.

**Чувствителност** е относителният дял на всички положителни/активни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на приложимостта на метода за изпитване.

**Специфичност** е относителният дял на всички отрицателни/неактивни химикали, които са класифицирани правилно чрез изпитването. Това е мярка за точността на метода за изпитване, която предоставя категорични резултати и е важен фактор при оценката на приложимостта на метода за изпитване.

**Изпитван химикал** е всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

**Утеротрофичен** е термин, използван за описване на положителното влияние върху растежа на тъканите на матката.

**Валидиране** е научна процедура, планирана за характеризиране на работните изисквания и ограничения на даден метод за изпитване, и за доказване на неговата надеждност и относимост за определена цел.

---

**Бележка:** Документ, изготвен от Секретариата на програмата относно насоките за изпитване въз основа на споразумението, постигнато на 6-тото заседание на Оперативната група по изпитване и оценка на нарушителите на функциите на ендокринната система

**Концептуална рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система**

|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Равнище 1</b></p> <p>Сортиране и приоритизиране върху съществуваща информация</p>                                | <ul style="list-style-type: none"><li>— физични и химични свойства, напр. ММ, реактивоспособност, летливост, биоразградимост</li><li>— експозиция на човека и окол.среда, напр. обем на производство, изпускания, употреби</li><li>— опасност, напр. токсикологични данни на разположение</li></ul>                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                       |
| <p><b>Равнище 2</b></p> <p>Изпитвания <i>in vitro</i> предоставящи механистични данни</p>                              | <ul style="list-style-type: none"><li>— Афинитет за свързване към рецептор ER, AR, TR</li><li>— Транскрипционно активиране</li><li>— Ароматаза и стероидогенеза <i>in vitro</i></li><li>— Разпознаване/свързване към рецептор за арилов въглевод.</li><li>— QSAR</li><li>— прескрининг висока производителност</li><li>— функция на щитовидната жлеза</li><li>— изследванена хепатоцити от риби (VTG)</li><li>— други (както е приложимо)</li></ul> |                                                                                                                                                                                       |
| <p><b>Равнище 3</b></p> <p>Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за отделни ендокринни механизми и ефекти</p>   | <ul style="list-style-type: none"><li>— Утеротрофично изследване (за естрогени)</li><li>— Изследване на Hershberger (за андрогени)</li><li>— Хормонална функция, несвързана с хормони</li><li>— Други (напр. щитовидна жлеза)</li></ul>                                                                                                                                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"><li>— изследв. на VTG (вителогенин) от риби (за естрогени)</li></ul>                                                                                |
| <p><b>Равнище 4</b></p> <p>Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за множество ендокринни механизми и ефекти</p> | <ul style="list-style-type: none"><li>— подобрен ОИСП 407 (крайни точки основани на ендокринни механизми)</li><li>— изследвания на мъжки и женски в пубертет</li><li>— изследване на невредими полово зрели мъжки</li></ul>                                                                                                                                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"><li>— Изсл. гонадна хистопатология при риби</li><li>— Изследване на метаморфоза при жаби</li></ul>                                                  |
| <p><b>Равнище 5</b></p> <p>Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за ефекти от ендокринни и други механизми</p>  | <ul style="list-style-type: none"><li>— изследване на 1 поколение (TG415 подобр.)<sup>1</sup></li><li>— изследване на 2 поколения (TG416подобр.)<sup>1</sup></li><li>— изп. скрининг на репродукция (TG421 подобр.)<sup>1</sup></li><li>— комбинирано скринингово изпитване 28 дни/репродукция (TG 422 подобр.)<sup>1</sup></li></ul> <p><sup>1</sup> Потенциални подобрения ще се разглеждат от ГУВб</p>                                           | <ul style="list-style-type: none"><li>— Изследвания за частичен и пълен жизнен цикъл при риби, птици, земно-водни и безгръбначни (на развиващия се организъм и репродукция)</li></ul> |

ГУВб: Група за управление на валидирането при изпитване и оценка на бозайници

## БЕЛЕЖКИ КЪМ РАМКАТА

- Бележка 1:** Въвеждане на всички равнища и напускане на всички равнища е възможно и зависи от естеството на съществуващите потребности от информация за целите на оценката на опасността и риска.
- Бележка 2:** На равнище 5 екотоксикологията следва да включва крайни точки, които дават показания за механизми за вредни ефекти, както и потенциални увреждания на равнище популация.
- Бележка 3:** Когато даден мултимодален модел покрива няколко от отделните изследвания на крайни точки, този модел следва да замени използването на тези изследвания на крайни точки
- Бележка 4:** Оценката на всеки химикал следва да се извършва въз основа на всеки отделен случай, като се взема предвид цялата достъпна информация и като се отчита функцията на равнищата на рамката.
- Бележка 5:** Към настоящия момент рамката не следва да се счита за всеобхватна. На равнища 3, 4 и 5 тя включва изследвания, които или са налични, или по отношение на тях е в ход валидиране. Що се отнася до последните, те са включени временно. След като бъдат разработени и валидирани, те ще бъдат официално добавени към рамката.
- Бележка 6:** Равнище 5 не следва да се разглежда като включващо само окончателни изпитвания. Счита се, че изпитванията, включени на това равнище, допринасят за общата оценка на опасността и риска.

## ЛИТЕРАТУРА

- (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 № 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 № 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 № 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 [<sup>125</sup>I]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 $\beta$ -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 № 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 № 425.
- (25) OECD (2000). Ръководство относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 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 № 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. № 71.
- (38) Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).

**Б.55. БИОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА HERSHBERGER ПРИ ПЛЪХОВЕ: КРАТКОСРОЧНО СКРИНИНГОВО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА (АНТИ)АНДРОГЕННИ СВОЙСТВА**

**УВОД**

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 441 (2009). През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите указания и по разработване на нови указания за скрининг и изпитвания за потенциални нарушители на функциите на ендокринната система (1). Един от елементите на дейността беше да се разработи указание за биологичното изследване на Hershberger при плъхове. След няколко десетилетия на употреба от фармацевтичната промишленост, това изследване е било първоначално стандартизирано от официален комитет от експерти през 1962 г. като скринингов метод за андрогенни химикали (2). През 2001—2007 г. биологичното изследване на Hershberger при плъхове е преминало обширна програма за валидиране, включваща изготвянето на контекстуален преглед (23), съставяне на подробен документ с методите (3), разработване на ръководство за дисекция (21) и провеждане на обширни вътрешно- и междублабораторни изследвания за показване на надеждността и възпроизводимостта на биологичното изследване. Тези изследвания за валидирането бяха проведени с мощен референтен андроген (тестостеронов пропионат (ТР)), два мощни синтетични андрогена (треболонов ацетат и метилтестостерон), мощен андрогенен лекарствен продукт (флутамид), мощен инхибитор на синтеза (финастерид) на естествен андроген (дихидротестостерон, ДНТ), няколко слаби антиандрогенни пестициди (линурон, винклозолин, процимидон, *p,p'*-ДДЕ), мощен инхибитор на 5 $\alpha$ -редуктаза (финастерид) и два известни отрицателни химикала (динитрофенол и нонилфенол) (4)(5)(6)(7)(8). Настоящият метод за изпитване е резултат от дългия исторически опит с биологичното изследване и опита, натрупан по време на програмата за изпитване за валидиране, и постигнатите резултати по нея.
2. Биологичното изследване на Hershberger е краткосрочно скринингово изследване *in vivo*, с използване на спомагателни тъкани от мъжката полова система. Изследването е с произход от 1930-те и е било изменено през 1940-те години, за да се включат реагиращите на андрогени мускули от мъжката полова система (2) (9—15). През 1960-те години над 700 възможни андрогена са били подложени на оценка, с използване на стандартизирана версия на протокола (2)(14), и използването на изследването както за андрогени, така и за антиандрогени е било считано за стандартен метод през 1960-те години (2)(15). Настоящото биологично изследване се основава на промените в телото на пет андрогенно зависими тъкани в кастрирани мъжки плъхове в перипубертетна възраст. С него се извършва оценка на способността на даден химикал да прояви биологична активност, съответстваща на андрогенни агонисти, антагонисти или инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза. Петте прицелни андрогенно зависими тъкани, включени в този метод за изпитване, са вентрален дял на простатата (VP), семенно мехурче (SV) (плюс течности и коагулиращи жлези), анален повдигач и луковичнопещерист мускул (LABC), чифтни жлези на Каупър (COW) и главичка на пениса (GP). При кастрираните мъжки плъхове в перипубертетна възраст всички тези пет тъкани реагират на андрогени с увеличение в абсолютно тегло. Когато същите тези тъкани са стимулирани да увеличат теглото си чрез прилагане на мощен референтен андроген, всичките тези пет тъкани реагират на антиандрогени с намаляване в абсолютно тегло. Изходен модел за биологичното изследване на Hershberger при плъхове е бил хирургически кастрираният мъжки плъх в перипубертетна възраст, който е бил валидиран при етапи 1, 2 и 3 от програмата за валидиране на изследването на Hershberger.
3. Биологичното изследване на Hershberger служи като механистично скринингово изследване *in vivo* за андрогенни агонисти, андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза и неговото прилагане следва да се разглежда в контекста на „Концептуалната рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система“ (Допълнение 2). В тази концептуална рамка биологичното изследване на Hershberger се съдържа в равнище 3 като изследване *in vivo*, предоставящо данни относно отделен ендокринен механизъм, т.е. (анти)андрогенност. То е предназначено да бъде включено в батерия от изпитвания *in vitro* и *in vivo* за установяване на химикали, които имат потенциала да взаимодействат с ендокринната система, които в крайна сметка водят до оценки на риска за човешкото здраве или околната среда.

4. Поради опасения, свързани с хуманното отношение към животните във връзка с процедурата по кастрация, с оглед избягване на етапа на кастрацията, като алтернативен модел за биологичното изследване на Hershberger са проучвани интактни (некастрирани) стимулирани отбити мъжки животни. Методът за изпитване със стимулирани отбити животни е валидиран (24); в изследванията за валидиране обаче вариантът с отбити животни на биологичното изследване на Hershberger не е успял, при изпитваните дози, последователно да открие предизвикани от слаби антиандрогени ефекти върху телата на андрогенно зависими органи. Поради това той не е включен в настоящия метод за изпитване. Същевременно, като се признава, че неговото използване може да предостави не само ползи за хуманното отношение към животните, но може също да предостави информация и за други начини на действие, същият е на разположение в Ръководство № 115 на ОИСР (25).

#### ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

5. Андрогенните агонисти и антагонисти действат като лиганди за андрогенния рецептор и могат да активират или съответно да потискат генната транскрипция, контролирана от рецептора. Освен това някои химикали инхибират превръщането на тестостерона в по-мощния естествен андроген дихидротестостерон в някои прицелни андрогенно зависими тъкани (инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза). Подобни химикали имат потенциал да доведат до опасност за здравето, включително ефекти върху репродукцията и развиващия се организъм. Поради това съществува регулаторна необходимост от бързо извършване на оценка на даден химикал като възможен андрогенен агонист или антагонист, или инхибитор на 5 $\alpha$ -редуктаза. Макар и даващ информация, афинитетът на даден лиганд към даден андрогенен рецептор, измерен чрез свързване към рецептор или транскрипционно активиране на репортерни гени *in vitro* не е единственият определящ фактор за евентуален риск. Други фактори включват метаболитно активиране и деактивиране при въвеждане в тялото, разпределение на химикала в прицелните тъкани, и клирънс от тялото. Това води до необходимост от скрининг на възможната активност на химикал *in vivo* при относими условия и експозиция. Оценката *in vivo* е по-малко решаваща, ако са известни характеристиките на химикала по отношение на абсорбция — разпределение — метаболизъм — екскреция (APME). Андрогенно зависимите тъкани реагират с бърз и енергичен растеж на стимулиране от андрогени, особено при кастрирани мъжки плъхове в перипубертетна възраст. Различни видове гризачи, особено плъховете, се използват също така широко в изследванията за токсичност за характеризиране на риска. Поради това, версията на изследването, при която се използват кастрирани плъхове в перипубертетна възраст и пет прицелни тъкани, е подходяща за скрининг *in vivo* на андрогенни агонисти и антагонисти, и инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза.
6. Настоящият метод за изпитване се основава на тези протоколи, използвани в изследването на ОИСР за валидиране, които са показали, че са надеждни и възпроизводими във вътрешно- и междублабораторни изследвания (4)(5)(6)(7)(8). В настоящия метод за изпитване са представени процедури както за андрогени, така и за антиандрогени.
7. Въпреки че е имало известно вариране в дозата на ТР за откриване на антиандрогени в програмата на ОИСР за валидиране на биологичното изследване на Hershberger при различните лаборатории (0,2 в сравнение с 0,4 mg/kg/ден, подкожно инжектиране), имало е малка разлика между тези два варианта на протоколи по отношение на способността за откриване на слаба или силна антиандрогенна активност. Ясно е обаче, че дозата на ТР не трябва да бъде толкова висока, че да блокира ефектите на антагонистите на рецепторите на слаби андрогени, нито толкова ниска, че андрогенните тъкани да реагират със слаб растеж дори без съвместно прилагане на антиандрогени.
8. Произходът на реакцията на растеж на отделните андрогенно зависими тъкани не е изцяло андрогенен, т.е. химикали, различни от андрогенни агонисти, могат да променят телото на някои тъкани. Независимо от това, реакцията на растеж от страна на няколко тъкани едновременно доказва в по-голяма степен андрогенно-специфичен механизъм. Например високи дози от мощни естрогени могат да увеличат телото на семенните мехурчета; другите андрогенно зависими тъкани от изследването обаче не реагират по подобен начин. Антиандрогенните химикали могат да действат като антагонисти на андрогения рецептор (AR) или като инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза. Инхибиторите на 5 $\alpha$ -редуктаза са с променлив ефект, тъй като превръщането в по-мощния дихидротестостерон варира в отделните тъкани. Антиандрогени, които потискат 5 $\alpha$ -редуктаза, като например финастерид, имат по-силно изразени ефекти във вентралния дял на простатата, отколкото в други тъкани, в сравнение с мощен антагонист на AR, като например флутамид. Тази разлика в тъканния отговор може да се използва, за да се направи разграничение между начина на въздействие чрез AR и този чрез 5 $\alpha$ -редуктаза. Освен това AR е еволюционно свързан с този на други стероидни хормони, и някои други хормони, прилагани при високи, надфизиологични нива на доза, могат да се свържат и да антагонизират стимулиращите растежа ефекти на ТР (13). Освен това, също така е реалистично засиленият стероиден метаболизъм и последващото намаляване на серумния тестостерон да намалят растежа на андрогенно зависими тъкани. Следователно, всякакви положителни резултати при биологичното изследване на Hershberger обикновено следва да бъдат оценявани с помощта на подход, основан на тежестта на доказателствата, включително изследвания *in vitro*, като изследванията за свързване към AR и естрогенни рецептори (ER), и съответстващите изследвания за транскрипционно активиране, или от други изследвания *in vivo*, които разглеждат сходни прицелни андрогенно зависими тъкани, като изследването на мъжки животни в пубертетна възраст, 15-дневното изследване на интактни полово зрели мъжки животни или 28-дневното или 90-дневното изследвания с повтарящи се дози.

9. Опитът сочи, че ксенобиотичните андрогени са по-редки от ксенобиотичните антиандрогени. Очакването следователно е, че биологичното изследване на Hershberger ще се използва най-често за скрининг на антиандрогени. Процедурата за изпитване за андрогени обаче може, независимо от това, да бъде препоръчана за стероидни или стероидоподобни химикали, или за химикали, за които показание за възможни андрогенни ефекти е било получено чрез методите, съдържащи се в равнище 1 или 2 от концептуалната рамка (допълнение 2). По подобен начин, неблагоприятни ефекти, свързани с (анти)андрогенни профили, могат да се наблюдават при изследвания на равнище 5 и да водят до необходимост от оценка на това дали даден химикал въздейства по ендокринен път.
10. Възприето е, че всички процедури, свързани с животни, следва да съответстват на местните стандарти за грижи за животните; описанията на грижите и третирането, изложени по-долу, представляват минимални стандарти за изпълнение и се заменят от местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (26). По-нататъшни указания за хуманното отношение към животните се дават от ОИСР (17).
11. Както при всяко биологично изследване с използване на опитни животни, необходимостта от извършване на това изследване трябва да бъде внимателно преценена. По същество може да има две причини за такова решение:
  - висок потенциал за експозиция (равнище 1 от Концептуалната рамка) или признаци за (анти)андрогенност в изследвания *in vitro* (равнище 2), подкрепящи проучване дали такива ефекти могат да настъпят *in vivo*;
  - ефекти, съответстващи на (анти)андрогенност в изпитвания *in vivo* от равнище 4 или 5, подкрепящи проучване на конкретния начин на действие, например за да се определи дали ефектите се дължат на (анти)андрогенен механизъм.
12. Определенията, използвани за този метод за изпитване, са дадени в допълнение 1.

#### ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

13. Чувствителността при биологичното изследване на Hershberger се постига чрез използване на мъжки животни с минимално ендогенно производство на андрогени. Това се постига чрез използването на кастрирани мъжки животни, при условие че е осигурено достатъчно време след кастрацията, за да може основното телло на прицелните тъкани да достигне минимална еднаква стойност. По този начин, при скрининг за потенциална андрогенна активност са налице ниски ендогенни нива на циркулиращи андрогени, хипоталамус-хипофиза-гонадна ос не е в състояние да компенсира чрез механизми за обратна връзка, способността на тъканите за даване на отговор е максимална, а варирането в началното тъканно телло е сведено до минимум. При скрининг за потенциална антиандрогенна активност, по-последователно наддаване на тъканно телло може да се постигне, когато тъканите се стимулират чрез референтен андроген. В резултат на това при биологичното изследване на Hershberger се изискват само 6 животни за група на определена доза, докато при други изпитвания с интактни мъжки животни, в пубертетна възраст или полово зрели, се предлага използване на 15 мъжки животни за група на определена доза.
14. Кастрирането на мъжките плъхове в перипубертетна възраст следва да се извърши по подходящ начин с използване на одобрени анестетици и асептична техника. През първите няколко дни след хирургичната интервенция следва да се прилагат обезболяващи средства, за да се елиминира постхирургичният дискомфорт. Кастрирането подобрява точността на изследването при откриване на слаби андрогени и антиандрогени чрез премахване на компенсаторните ответни ендокринни механизми, съществуващи в интактното животно, които могат да смекчат последиците от прилаганите андрогени и антиандрогени, и чрез премахване на голямото вариране на равнищата на серумен тестостерон между отделните индивиди. Следователно, кастрацията намалява броя на животните, изисквани с цел скрининг на тази ендокринна активност.
15. При скрининг за потенциална андрогенна дейност, изпитваният химикал се приема всекидневно по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране за период от десет последователни дни. Изпитваните химикали се прилагат най-малко на две третирани групи от опитни животни, като за всяка група се използва по едно ниво на доза. Животните се подлагат на аутопсия приблизително 24 часа след последната доза. Статистически значимо увеличение на теллото на два или повече прицелни органа в третираните с изпитвания химикал групи спрямо контролната група на носител показва, че изпитваният химикал е положителен по отношение на потенциална андрогенна активност (вж. параграф 60). Андрогени, като например тренболон, които не могат да бъдат 5 $\alpha$ -редуцирани, имат по-силно изразени ефекти върху LABC и GP спрямо TP, но всички тъкани следва да показват увеличен растеж.
16. При скрининг за потенциална андрогенна дейност, изпитваният химикал се приема всекидневно по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране за период от десет последователни дни, съгласувано с ежедневни дози TP (0,2 или 0,4 mg/kg/ден) чрез подкожно инжектиране. В програмата за валидиране е установено, че могат да се използват или 0,2 или 0,4 mg/kg/ден TP, тъй като и двете са ефективни в откриването на антиандрогени, и

следователно само една доза следва да бъде избрана за използване при изследването. Постепенни дози от изпитвания химикал се прилагат в най-малко три третиранни групи от опитни животни, като се използва по една доза за група. Животните се подлагат на аутопсия приблизително 24 часа след последната доза. Статистически значимо намаление на теглото на два или повече прицелни органа в третираните с изпитвания химикал плюс ТР групи спрямо контролната група само на ТР показва, че изпитваният химикал е положителен по отношение на потенциална антиандрогенна активност (вж. параграф 61.).

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Избор на вида и породата

17. Плъховете и мишки се използват редовно за биологичното изследване на Hershberger от 1930-те години насам. Въпреки че от биологична гледна точка е реалистично и плъховете, и мишките да покажат сходен отговор, въз основа на 70-годишния опит с модела с плъхове, плъхът е избраният вид за биологичното изследване на Hershberger. В допълнение, когато данните от дадено биологичното изследване на Hershberger могат да бъдат предвидими по отношение на дългосрочно изследване върху няколко поколения, това позволява в двете изследвания да се използват животни от същите вид, порода и източник.
18. Този протокол позволява на лабораториите да избират породата на плъховете, която да използват при изследването, и която по принцип би следвало да бъде традиционно използваната от участващата лаборатория. Могат да се използват обичайно използваните лабораторни породи плъхове; породи, при които зрялата възраст настъпва значително по-късно от 42 дни обаче не бива да се използват, тъй като кастриране на мъжки животни на възраст 42 дни би могло да изключи измерване на теглото на главичката на penis, което може да бъде направено единствено след отделянето на препуциума от тялото на penis. По този начин породите, получени от плъха Fisher 344, не трябва да се използват, с изключение на някои редки случаи. Плъхът Fisher 344 има различен времеви график по отношение на сексуалното развитие в сравнение с други по-често използвани породи като Sprague Dawley или Wistar (16). Ако трябва да бъде използвана тази порода, лабораторията би следвало да кастрира плъховете от нея на малко по-късна възраст и да е в състояние да демонстрира чувствителността на използваната порода. Обосновката за избора на породата плъхове следва да бъде ясно посочена от лабораторията. Когато скрининговото изследване може да служи като предварително за изследване на оралната токсичност с повтаряща се доза, за изследване на токсичността за репродукцията и за развиващия се организъм, или за дългосрочно изследване, за предпочитане е при всички изследвания да бъдат използвани животни от една и съща порода и източник.

##### Условия на отглеждане и хранене

19. Всички процедури трябва да са в съответствие с всички местни стандарти за полагане на грижи за лабораторни животни. Тези описания на грижите и третирането представляват минимални стандарти и се заменят от по-строги местни разпоредби, като например Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 г. относно защитата на животните, използвани за научни цели (26). Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде 22 °C (с приблизително отклонение  $\pm 3$  °C). Относителната влажност следва да бъде най-малко 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 % освен по време на почистване на помещението. Целта следва да бъде относителна влажност 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено. Ежедневната последователност при осветлението трябва да е 12 часа светлина, 12 часа тъмнина.
20. Отглеждането в група е за предпочитане пред изолацията, поради младата възраст на животните и поради факта, че плъховете са социални животни. Чрез отглеждането на две или три животни в клетка се избягва струпване и свързвания с него стрес, които могат да попречат на хормоналния контрол на развитието на спомагателни тъкани от половата система. Клетките трябва да бъдат щателно почистени за отстраняване на възможни замърсители и подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. С клетки с подходящ размер (~ 2000 кв. см) струпването се предотвратява.
21. Всяко животно трябва да бъде отделно идентифицирано (например с ушна марка или етикет) с използване на хуманен метод. Методът на идентифициране трябва да бъде записан.
22. Лабораторна храна и питейна вода трябва да се предоставят *ad libitum*. Лабораторията, извършваща биологичното изследване на Hershberger, следва да използва лабораторния хранителен режим, който тя обикновено използва в работата си по изпитване на химикали. При проучванията за валидиране на биологичното изследване не са наблюдавани ефекти или вариране, които да могат да бъдат приписани на хранителния режим. Използваният хранителен режим трябва да бъде записан и следва да бъде запазена проба от лабораторния хранителен режим за евентуален бъдещ анализ.

##### Критерии за параметрите на теглото на андрогенно зависимите органи

23. По време на изследването за валидиране не са открити доказателства за това, че намаляването на телесното тегло е засегнало увеличаването или намаляването на теглото на прицелните тъкани (т.е., онези, които трябва да бъдат претеглени в посоченото изследване).

24. Сред различните породи плъхове, използвани успешно в програмата за валидиране, телото на андрогенно зависими органи при породите с по-голямо телло е по-голямо, отколкото при породите с по-малко телло. Поради това критериите за параметрите на телото при биологичното изследване на Hershberger не включват очаквани абсолютни стойности на телото на органите за положителните и отрицателните контроли.
25. Тъй като коефициентът на вариация (CV) за дадена тъкан е обратнопропорционален на статистическата мощност, критериите за параметрите при биологичното изследване на Hershberger са основани върху максималните стойности на CV за всяка тъкан (Таблица 1). Коефициентите на вариация са получени от изследванията на ОИСП за валидиране. В случай на отрицателни резултати, лабораториите следва да проучат коефициентите на вариация от контролната група и третираната с висока доза група, за да определят дали свързаните с максималните стойности на CV критерии за параметрите са били превишени.
26. Изследването трябва да се повтори, когато: 1) три или повече от десетте възможни отделни коефициенти на вариация от контролната група и третираната с висока доза група надвишават максимумите, определени за изследвания на агонисти и антагонисти в таблица 1, и 2) поне две прицелни тъкани са били засегнати незначително, т.е. стойностите на  $r$  за тях са между 0,05 и 0,10.

Таблица 1

**Максимално допустими коефициенти на вариация, определени за прицелните спомагателни тъкани от половата система за модела с кастрирани животни в изследванията на ОИСП за валидиране <sup>(1)</sup>**

| Тъкан                       | Антиандрогенни ефекти | Андрогенни ефекти |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------|
| Семенни мехурчета           | 40 %                  | 40 %              |
| Вентрален дял на простатата | 40 %                  | 45 %              |
| LABC                        | 20 %                  | 30 %              |
| Жлези на Каупър             | 35 %                  | 55 %              |
| Главичка на пениса          | 17 %                  | 22 %              |

#### ПРОЦЕДУРА

##### Спазване на регулаторните изисквания и проверка на лабораторията

27. За разлика от утеротрофичното биологично изследване (глава Б.54 от настоящото приложение), демонстрация на пригодността на лабораторията преди началото на изследването не е необходима за биологичното изследване на Hershberger, тъй като изпитването на паралелните положителни (тестостеронов пропионат и флутамид) и отрицателни контроли се провежда независимо като неразделна част от изследването.

##### Брой и състояние на животните

28. Всяка третирана и контролна група трябва да включва минимум 6 животни. Това се отнася както за андрогенните, така и за антиандрогенните протоколи.

##### Кастриране

29. Трябва да има първоначален период за аклиматизация от няколко дни след получаване на животните, за да се гарантира, че животните са в добро здраве и се развиват добре. Тъй като при животните, кастрирани на възраст по-малка от 42 дни, или преди постнатален ден (ПНД) 42, може да не е настъпило отделяне на препуциума, животните следва да бъдат кастрирани на ПНД 42 или след това, но не и преди това. Животните се кастрират под анестезия чрез инцизия в скротума и отстраняване както на тестисите, така и на епидидимите, и с лигиране на кръвоносните съдове и отводните канали на семенните мехурчета. След потвърждаване, че не се наблюдава кръвотечение, скротумът трябва да бъде затворен с хирургичен шев или с автоматични скоби (autoclips). Животните следва да бъдат третирани с обезболяващи средства през първите няколко дни след хирургичната интервенция за смекчаване на всякакъв постхирургичен дискомфорт. Ако кастрираните животни са закупени от доставчик на животни, възрастта на животните и степента на полово зрялост следва да бъдат гарантирани от доставчика.

<sup>(1)</sup> Праговият CV за дадена тъкан е бил идентифициран от графика на подредени от най-малката последователно до най-голямата стойности на CV за всички средни стойности от всички опити, свързани с валидирането, използващи конкретен модел (агонист или антагонист). Праговият CV е отчетен от „точката на прекъсване“ — точката, от която увеличението между следващите CV с най-високи стойности от последователността са значително по-големи от увеличението, които разделят няколкото предходни CV. Следва да се отбележи, че въпреки че в резултат на този анализ са определени относително надеждни „точки на прекъсване“ за модела на изследване с антагонист, кривите на CV за изследването с агонист са показали по-еднообразно увеличение, поради което идентификацията на прагов CV по този метод е била в известна степен произволна.

**Аклиматизация след кастрирането**

30. Аклиматизацията на животните към лабораторните условия следва да продължи, за да се даде възможност за намаляването на телното на прищелната тъкан за период най-малко от 7 дни след кастрирането. Животните трябва да бъдат наблюдавани ежедневно и всички животни с признаци на заболяване или физически аномалии следва да бъдат отстранени. По този начин, началото на третирането чрез започване на дозирането (по време на изследването) може да започне на възраст от ПНД 49, но не по-късно от ПНД 60. Възрастта при аутопсията не трябва да надвишава ПНД 70. Тази гъвкавост позволява на лабораториите да изготвят ефикасен график на експерименталните дейности.

**Телесно тегло и разпределение по групи на случаен принцип**

31. Различията в индивидуалните телесни тегла са източник на вариране в телното на тъканите както в рамките на дадена група животни, така и между групите от животни. Увеличеното вариране в телното на тъканите води до увеличен коефициент на вариация (CV) и намалява статистическата мощност на изследването (наричана понякога чувствителност на изследването). Поради това колебанията в телесното тегло следва да бъдат контролирани както експериментално, така и статистически.
32. Експерименталният контрол включва предизвикване на малки колебания в телесното тегло в рамките на отделните изследвани групи и между тях. Първо, необичайно малки или големи животни трябва да се избягват и да не се поставят в изследваната кохорта. При започване на изследването колебанията в телното на използваните животни не трябва да превишават  $\pm 20\%$  от средното тегло (например  $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$  за кастрирани плъхове в перипубертетна възраст). Второ, животните трябва да бъдат разпределени към групи (както контролни, така и третирани) чрез случайно разпределение по тегло, така че средното телесно тегло във всяка група да не е статистически различно от това в която и да е друга група. Процедурата за случаен подбор по блокове, която се използва, трябва да бъде записана.
33. Тъй като токсичността може да доведе до намаляване на телесното тегло на третираните групи по отношение на контролната група, като статистически ковариант може да се използва телесното тегло през първия ден от прилагането на изпитвания химикал, а не телесно тегло към момента на аутопсията.

**Дозиране**

34. С цел да се установи дали даден изпитван химикал може да има андрогенно действие *in vivo*, две групи с определена доза от изпитвания химикал плюс положителна контрола и контрола на носител (отрицателна) (вж. параграф 43) обичайно са достатъчни и затова тази постановка е предпочитана от съображения за хуманно отношение към животните. Ако целта е да се получи крива доза-отговор или да се екстраполира към по-ниски дози, необходими са най-малко 3 групи с определена доза. Ако се изисква информация извън тази за андрогенната активност (като например оценка на ефикасността), трябва да бъде взета под внимание отделна схема на дозиране. За изпитване за антиандрогени, изпитваният химикал се прилага заедно с референтен андрогенен агонист. Следва да се използват най-малко 3 изпитвани групи с различни дози на изпитвания химикал и положителна и отрицателна контрола (вж. параграф 44). С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролната група трябва да бъдат отглеждани по идентичен начин на този при животните от изпитваната група. Ако за прилагане на изпитвания химикал се използва носител, контролната група трябва да получава най-голямото използвано при изпитваните групи количество носител.
35. Всички нива на доза следва да се предлагат и подбират, като се имат предвид всички достъпни токсикологични и токсикокинетични данни за изпитвания химикал или за свързани с него материали. Най-високото ниво на доза следва, първо, да вземе под внимание стойността на  $LD_{50}$  и/или информация за остра токсичност с цел да се избегне смърт, силно страдание или дистрес при животните (17)(18)(19)(20) и, второ, да вземе предвид наличната информация за използваните дози в субхронични и хронични проучвания. Като цяло, най-високата доза следва да не предизвиква намаляване в крайното телесно тегло на животните, по-голямо от  $10\%$  от контролното тегло. Най-високата доза следва да бъде по-ниската от следните: 1) най-високата доза, която гарантира оцеляването на животното и която е без значителна токсичност или дистрес на животните след 10 последователни дни на прилагане до максимална доза от  $1\ 000\text{ mg/kg/ден}$  (вж. параграф 36), или 2) доза, предизвикваща (анти)андрогенни ефекти. Като скрининг, големи интервали, напр. половин логаритмична единица, отговаряща на кратност на дозата, равна на 3,2, или дори една логаритмична единица между дозиранията са общоприемливи. Ако няма достъпни подходящи данни, може да се проведе изследване за определяне на обхвата (вж. параграф 37), което да подпомогне определянето на използваните дози.

**Равнище на пределна доза**

36. Ако изпитване при гранична доза от  $1\ 000\text{ mg/kg}$  телесно тегло на ден и по-ниска доза, с използване на процедурите, описани в това изследване, не успее да предизвика статистически значима промяна в телното на репродуктивните органи, допълнителни нива на доза могат да бъдат счестени за ненужни. Пределната доза се прилага, освен когато данните за експозиция на хора подсказват нуждата от използване на по-високо ниво на доза.

**Съображения при определянето на обхвата**

37. Ако е необходимо, може да се извърши предварително изследване за определяне на обхвата, с малко на брой животни, за да се изберат подходящи групи с определена доза [с използване на методи за изпитване за остра токсичност (глави Б.1А, Б.1Б от настоящото приложение (27), ОИСП TG 425 (19)]. Целта в случая на биологичното изследване на Hershberger е да се изберат дози, които гарантират оцеляването на животните, и които са без значителна токсичност или дистрес за животните след десет последователни дни на прилагане на химикала до пределна доза от 1 000 mg/kg/ден, както е посочено в параграфи 35 и 36. В това отношение може да се използва ръководство на ОИСП (17) за определяне на клиничните признаци, които показват токсичност или дистрес за животните. Ако е осъществимо в рамките на това изследване за определяне на обхвата след десет дни от прилагането, прицелните тъкани могат да бъдат изрязани и претеглени приблизително 24 часа след прилагане на последната доза. След това тези данни биха могли да се използват за подпомагане на избора на дозите в основното изследване.

**Референтни химикали и носител**

38. Референтният андрогенен агонист следва да бъде тестостеронов пропионат (ТР), CAS № 57-82-5. Референтната доза ТР може да бъде или 0,2 mg/kg телесно тегло на ден или 0,4 mg/kg телесно тегло на ден. Референтният андрогенен антагонист следва да бъде флутамид (FT), CAS № 1311-84-7. Референтната доза FT следва да бъде 3 mg/kg телесно тегло на ден, и FT следва да се прилага съвместно с референтната доза ТР.
39. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на воден разтвор/суспензия. Но тъй като много андрогенни лиганди или техните метаболитни прекурсори са хидрофобни, най-често използваният подход е използване на разтвор/суспензия в масло (напр. царевично, фъстъчено, сусамово или маслиново масло). Изпитваните химикали могат да бъдат разтворени в минимално количество 95 % етанол или други подходящи разтворители, и разредени до окончателните работни концентрации в изпитвания носител. Токсичните характеристики на разтворителя трябва да бъдат известни и следва да се изпитат в отделна контролна група само на разтворител. Ако изпитваният химикал се счита за стабилен, може да се използва слабо нагряване и енергично механично действие за подпомагане на разтварянето на изпитвания химикал. Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носителя. Ако изпитваният химикал е стабилен за периода на изследването, тогава може да бъде приготвена една начална аликвотна част от изпитвания химикал, и определените разреждания на дозата да се приготвят всеки ден, като се внимава да се избегне замърсяване или разваляне на пробите.

**Прилагане на дозите**

40. ТР следва да бъде прилаган чрез подкожна инжекция, а FT — по орален път през сонда.
41. Изпитваният химикал се прилага по орален път през сонда или чрез подкожно инжектиране. Съображенията за хуманно отношение към животните и физичните/химичните свойства на изпитвания химикал трябва да се вземат под внимание при избора на пътя на прилагане. В допълнение, токсикологичните аспекти, като например относителност към пътя на експозиция на химикала при хора (напр. относителност на орален път през сонда към експозиция чрез поглъщане, или на подкожно инжектиране към вдишване или към дермална адсорбция) и съществуващата токсикологична информация и данни за метаболизма и кинетиката (напр. необходимост да се избегне ефектът на първото преминаване, по-добра ефикасност чрез конкретен път) следва да бъдат взети предвид, преди да се започне изчерпателно дългосрочно изпитване, ако се получат положителни резултати чрез инжектиране.
42. Животните трябва да бъдат дозирани по същия начин и в същата времева последователност за срок от десет последователни дни на приблизително 24-часови интервали. Нивото на дневната доза трябва да се коригира ежедневно въз основа на паралелните дневни измервания на телесното тегло. Обемът на дозата и часът на нейното прилагане трябва да се отчитат за всеки ден на експозиция. Трябва да се вземат мерки, за да не се превишава максималната доза, описана в параграф 35, за да се даде възможност за съдържателно тълкуване на данните. Намаляването на телесното тегло, клиничните признаци и други находки следва да бъдат подробно оценени в това отношение. За орален път през сонда трябва да се използва стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Максималният обем течност, който може да бъде въведен еднократно, зависи от телесното тегло на изпитваното животно. Следва да се спазват местните насоки за грижи за животните, но обемът не следва да превишава 5 ml/kg телесно тегло, освен в случай на водни разтвори, където могат да бъдат използвани 10 ml/kg телесно тегло. За подкожни инжекции в дорзално-скапуларната и поязната област дозите трябва да се прилагат посредством стерилна игла (напр. 23G или 25G) и туберкулинова спринцовка. Бръсненето на мястото на инжектиране е по избор. Всякакви загуби, изтичане на мястото на инжектиране или непълно дозиране трябва да бъдат записвани. Общият инжектиран обем на пълх на ден не трябва да надхвърля 0,5 ml/kg телесно тегло.

**Специфични процедури за андрогенни агонисти**

43. За изпитването на андрогенни агонисти носителът е отрицателната контрола, а третираната с ТР група е положителната контрола. Биологичната активност, съответстваща на андрогенните агонисти, се изпитва с прилагане на изпитван химикал на третираните групи в избраните дози за 10 последователни дни. Теглата на петте спомагателни тъкани от половата система в групите на изпитван химикал се сравняват с тези в групите на носител за откриване на статистически значими увеличения на теглото.

**Специфични процедури за андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза**

44. За изпитването на андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза, третираната с ТР група е отрицателната контрола, а групата, на която се прилагат съвместно референтни дози ТР и FT е положителната контрола. Биологичната активност, съответстваща на андрогенни антагонисти и инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза, се изпитва с прилагане на референтна доза ТР и прилагане на изпитвания химикал в продължение на 10 последователни дни. Теглата на петте спомагателни тъкани от половата система в групите на ТР плюс групите на изпитван химикал се сравняват с тези в групата само на референтен ТР за откриване на статистически значими намаления на теглото.

**НАБЛЮДЕНИЯ****Клинични наблюдения**

45. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно и по-често, когато се наблюдават признаци на токсичност. Наблюденията следва да се извършват за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид върховият период на предвидените ефекти след получаване на дозата. Всички животни следва да бъдат наблюдавани за смъртност, заболяемост и общи клинични признаци като промяна в поведението, кожата, козината, очите, мукозните мембрани, поява на секреция и екскреция, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане).
46. Всяко животно, намерено мъртво, следва да се отстрани и унищожи без допълнителен анализ на данни. Всякаква смъртност на животни преди аутопсия, следва да бъде записана в изследването, заедно с всички видими причини за смъртността. Всяко животно в терминално състояние трябва да бъде умъртвено по хуманен начин. Всяко животно, което е в терминално състояние и впоследствие е подложено на евтаназия, следва да бъде записано в изследването, заедно с видими причини за терминалното състояние.

**Телесно тегло и консумация на храна**

47. Всички животни трябва да бъдат претегляни дневно с точност до 0,1 g, като се започне точно преди започване на третирането, т.е., когато животните се разпределят на групи. Като незадължително измерване, количеството на консумираната храна през периода на третиране може да бъде измерено за отделната клетка чрез претегляне на хранилката. Резултатите за консумацията на храна следва да бъдат изразени в грамове на плъх дневно.

**Дисекция и измерване на теглото на тъкани и органи**

48. Приблизително 24 часа след последното прилагане на изпитвания химикал, плъховете следва да бъдат подложени на евтаназия и обезкръвени съгласно обичайните процедури на извършващата лаборатория, и да им бъде извършена аутопсия. Методът на умъртвяване по хуманен начин следва да бъде записан в доклада на лабораторията.
49. В идеалния случай аутопсията следва да се извърши на случаен принцип между различните групи, за да се избегне поставянето на дадена група на първо или последно място, което може да повлияе на данните. Всяка констатация по време на аутопсията, т.е., патологични изменения/видими увреждания, следва да се отбележи и докладва.
50. Петте андрогенно зависими тъкани (VP, SV, LABC, COW, GP) следва да бъдат претеглени. Тези тъкани трябва да бъдат изрязани, внимателно почистени от излишна прилепнала тъкан и мазнина, и трябва да бъде определено теглото им в пряно състояние (нефиксирано). С всяка тъкан следва да се борави с особено внимание, за да се избегнат загубата на течности и изсушаването, които могат да доведат до значителни грешки и вариране чрез намаляването на записаните тегла. Няколко от тъканите могат да бъдат много малки или трудни за дисекция, и това води до вариране. Следователно е важно лицата, извършващи дисекцията на спомагателни тъкани от половата

система, да са запознати със стандартните процедури за дисекция за тези тъкани. Наръчник за стандартна работна процедура (СПП) за дисекция е на разположение от ОИСР (21). Внимателното обучение в съответствие с ръководството за СОП ще сведе до минимум даден потенциален източник на колебания в изследването. В идеалния случай същият просектор следва да носи отговорност за дисекцията на дадена тъкан, за да се елиминират разликите между различните просектори при обработката на тъканта. Ако това не е възможно, аутопсията трябва да се планира така, че всеки просектор да извършва дисекция на дадена тъкан от всички третирани групи, вместо това един просектор да извършва дисекция на всички тъкани от дадена контролна група, докато друг отговаря за третираните групи. Всяка спомагателна тъкан от половата система трябва да бъде претеглена без изсушаване с точност до 0,1 mg, като теглото се записва за всяко животно.

51. Няколко от тъканите могат да бъдат много малки или трудни за дисекция, и това води до вариране. Предходният опит показва обхват на коефициента на вариация, който изглежда се различава на основата на различната пригодност на лабораторията. В няколко случая в рамките на конкретна лаборатория са наблюдавани големи разлики в абсолютните тегла на тъкани като VP и COW.
52. Измерванията на черен дроб и чифтни органи като бъбрек и надбъбречна жлеза са по избор. Отново, тъканите трябва да бъдат почистени от прилепнала фасция и мазнини. Черният дроб трябва бъде претеглен и записан с точност до 0,1 g, а чифтни органи като бъбрек и надбъбречна жлеза — с точност до 0,1 mg. Черният дроб, бъбреците и надбъбречните жлези не само се влияят от андрогени; те също така дават полезни показания за системна токсичност.
53. Измерването на серумен лутеинизиращ хормон (LH), фоликулостимулиращ хормон (FSH) и тестостерон (T) е по избор. Серумните равнища на T са полезни за определяне дали изпитваният химикал предизвиква понижаваш серумните равнища метаболизъм на тестостерона в черния дроб. Без данни за T подобен ефект може да изглежда като предизвикан по андрогенен механизъм. Равнището на LH предоставя информация за способността на даден антиандроген не само да намали теглото на органите, но и да засегне хипоталамус-хипофизната функция, което при продължителни изследвания може да предизвика тумори на тестисите. FSH е важен хормон за сперматогенезата. Измерванията на серумните T4 и T3 също са по избор и могат да предоставят полезна допълнителна информация относно способността за нарушаване на хомеостазата на тиреоидните хормони. Ако следва да се извършват измервания на хормон, пъховете трябва да бъдат анестезирани преди аутопсията и кръвта да се вземе чрез сърдечна пункция, като методът за анестезия трябва да бъде избран внимателно с оглед да не се отрази на измерването на хормона. Методът на изготвяне на серума, източникът на комплекти за измерване за радиоимунното изследване или на други комплекти за измерване, процедурите за анализ, както и резултатите следва да бъдат записани. Равнищата на LH следва да бъдат отчитани в ng/ml серум, и T трябва също така да бъде отчитан в ng/ml серум.
54. Дисекцията на тъканите се описва като следва с подробен наръчник за дисекция със снимки, публикуван като спомагателен материал като част от програмата за валидиране (21). На разположение е също така и видеоизображение на дисекцията на интернет страницата на Корейската администрация по храните и лекарствата (22).
  - С обърната нагоре вентрална повърхност на животното се определя дали препуциумът на пениса е отделен от главичката на пениса. Ако е така, тогава препуциумът се отдръпва и главичката на пениса се отстранява и претегля (с точност до 0,1 mg), и теглото се записва;
  - Кожата на корема и коремната стена се отварят, при което се разкриват вътрешностите. Ако се претеглят органите по избор, отстранява се и се претегля черният дроб с точност до 0,1 g, отстраняват се стомахът и червата, отстраняват се и се претеглят чифтовете бъбреци и надбъбречни жлези с точност до 0,1 mg. Тази дисекция разкрива пикочния мехур и започва дисекцията на прицелните спомагателни тъкани от мъжкото животно.
  - За дисекция на VP пикочният мехур се отделя от слоя на коремния мускул чрез разрез на съединителната тъкан по средната линия. Пикочният мехур се отстранява в предна позиция към семенните мехурчета (SV), при което се разкриват левият и десният дял от вентралния дял на простатата (обхванати от слой от мазнини). Внимателно се раздалечава мазнината от левия и десния дял на VP. Леко се отстранява десният дял на VP от уретрата и се дисектира дялът от уретрата. Докато все още се придържа десният дял на VP, леко се отстранява левият дял на VP от уретрата и след това се дисектира; претегля се с точност до 0,1 mg и се записва теглото.
  - За дисекция на семенните мехурчета с коагулиращите жлези (SVCG) пикочният мехур се отстранява каудално, при което се разкриват семепроводът и десният и левият дял на SVCG. Предотвратява се изтичането на течност чрез прикрепване на хемостат в основата на SVCG, където семепроводът се свързва с уретрата. Внимателно се извършва дисекция на SVCG, с прикрепен хемостат се почистват мазнините и придатъците, поставя се в тарирано тегловно блюдо, отстранява се хемостатът, претегля се с точност до 0,1 mg и се записва теглото.

- За дисекция на LABC се разкриват мускулите и основата на пениса. Мускулите на аналния повдигач (LA) са увити около колона, докато предните LA и луковичнопешерист мускул (BC) са прикрепени към луковиците на пениса. Кожата и придатъците от перианалната област, простираща се от основата на пениса до предния край на ануса, се отстраняват. На мускулите на BC постепенно се извършва дисекция от луковицата и тъканите на пениса. Колонът се срязва на две и може да бъде извършена дисекция на LABC и те да бъдат напълно отстранени. LABC се почистват от мазнини и придатъци, претеглят се с точност до 0,1 mg и теглото се записва.
  - След отстраняване на аналния повдигач и луковичнопешеристия мускул в основата на луковиците на пениса и леко дорзално от тях се виждат жлезата на Каупър или булбоуретралната жлеза. Изисква се внимателна дисекция, за да се избегне връзване в тънката капсула с оглед предотвратяване на изтичането на течност. Чифтните COW се претеглят с точност до 0,1 mg и теглото се записва.
  - В допълнение, ако по време на аутопсия или дисекция е изгубена течност от някоя жлеза, това трябва да бъде записано.
55. Ако оценката на всеки химикал изисква аутопсия на повече от разумното животно за един ден, началото на изследването може да се разпреди върху два последователни дни, в резултат на което аутопсията и свързаната с нея работа също се разпределя върху два дни. Ако е извършено такова разпределение, дневно следва да бъдат използвани половината от животните от третирана група.
56. Трупове следва да бъдат унищожавани по подходящ начин след аутопсията.

#### ДОКЛАДВАНЕ

##### Данни

57. Данните следва да се отчитат индивидуално (т.е. телесно тегло, тегла на спомагателни тъкани от половата система, измервания по избор и други отговори и наблюдения) и за всяка група от животни (средни стойности и стандартни отклонения за всички извършени измервания). Данните следва да бъдат обобщени в табличен вид. Данните трябва да показват броя на животните в началото на изпитването, броя на животните, намерени мъртви по време на изпитването или показващи признаци на токсичност, описание на наблюдаваните признаци на токсичност, включително време на настъпването им, продължителност и сила.
58. Заклучителният доклад следва да включва:

#### Извършваща изпитвания лаборатория

- Наименование на лабораторията, местоположение на лабораторията
- Ръководител на изследването и друг персонал и отговорностите им във връзка с изследването
- Дати, на които е започнало и приключило изследването, т.е. първи ден от прилагането на изпитвания химикал и съответно последен ден на аутопсията.

#### Изпитван химикал

- Източник, партида/номер на партидата, идентичност, чистота, пълен адрес на доставчика и характеризирание на изпитвания(те) химикал(и)
- Физична природа и, където е относимо, физични и химични свойства;
- Условия на съхранение и метод и честота на изготвяне на разредени разтвори
- Всички събрани данни за стабилност
- Всички анализи на разтворите/суспензиите за дозиране

#### Носител

- Характеризирание на носителя (идентичност, доставчик и номер на партида)
- Обосновка за избора на носител (когато носителят е различен от вода)

#### Изпитвани животни и процедури за отглеждане на животните

- Използван вид/порода и обосновка за избора
- Източник или доставчик на животни, включително пълен адрес
- Брой и възраст на доставените животни

- Условия на отглеждане (температура, осветление и др.)
- Хранителен режим (наименование, вид, доставчик, номер на партида, съдържание и, ако са известни, нива на фитоестрогени)
- Материал за постилане (наименование, вид, доставчик, съдържание)
- Условия на поставяне в клетки и брой на животните в клетка;

#### *Условия на изследването*

- Възраст при кастрирането и продължителност на аклиматизацията след кастрирането;
- Индивидуални тегла на животните в началото на изследването (с точност до 0,1 g);
- Процедура за разпределяне на случаен принцип и запис за разпределяне по групи на носител, референтен химикал, изпитван химикал и по клетки.
- Средна стойност и стандартно отклонение на телесните тегла за всяка група за всеки ден, в който се извършва претегляне по време на цялото изследване;
- Обосновка на избора на доза;
- Път за прилагането на изпитвания химикал и обосновка за избора на път на експозиция
- При изследване за антиандрогенност, третиране с ТР (доза и обем),
- Третиране с изпитван химикал (доза и обем),
- Час на дозиране
- Процедури по аутопсията, включително начини за обезкръвяване и всякаква анестезия
- Ако се извършват анализи на серум, следва да бъдат дадени подробности за метода. Например, ако се използва радиоимунно изследване (RIA), следва да бъдат докладвани процедурата на RIA, източникът на комплекти за RIA, сроковете на годност на комплектите, процедурата за скитилационно броене, както и дейности по стандартизация.

#### *Резултати*

- Ежедневни наблюдения за всяко животно по време на дозиране, включително:
- Телесно тегло (с точност до 0,1 g)
- Клинични признаци (ако има такива),
- Всяко измерване или бележки относно консумацията на храни.
- Бележки от аутопсията за всяко животно, включително:
- Дата на аутопсията,
- Третирана група на животното,
- ID на животното,
- Просектор,
- Време от деня, през което са извършени аутопсията и дисекцията,
- Възраст на животното,
- Крайно телесно тегло при аутопсия, с отбелязване на всички статистически значими увеличавания или намалявания,
- Ред на обезкръвяване и дисекция на животните при аутопсията,
- Тегло на петте прицелни андрогенно зависими тъкани:
- Вентрален дял на простатата (с точност до 0,1 mg)
- Семенни мехурчета плюс коагулиращите жлези, включително течността (по двойки, с точност до 0,1 mg)
- комплекс анален повдигач и луковичнопещерист мускул (с точност до 0,1 mg)
- Жлези на Каупър (свежо тегло — по двойки, с точност до 0,1 mg).
- Главичка на пениса (свежо тегло, с точност до 0,1 mg)

- Тегла на тъкани, измерени по избор, ако са измерени:
- Черен дроб (с точност до 0,1 g)
- Бъбрек (по двойки, с точност до 0,1 mg)
- Надбъбречна жлеза (по двойки, с точност до 0,1 mg)
- Общи бележки и коментари
- Анализи на серумни хормони, ако са извършени.
  - Серумен LH (по избор — ng/ml серум), и
  - Серумен T (по избор — ng/ml серум)
- Общи бележки и коментари

#### Обобщаване на данните

Данните следва да се обобщят в таблична форма, съдържаща размера на извадката за всяка група, средната стойност и стандартната грешка в средната стойност или стандартното отклонение. Таблиците следва да включват телесни тегла при аутопсия, изменения в телесното тегло от началото на дозирането до аутопсията, тегла на прицелните спомагателни тъкани от половата система и всякакви други тегла на органи, измерени по избор.

#### Обсъждане на резултатите

##### Анализ на резултатите

59. Теглата на тялото и органите при аутопсия следва да бъдат статистически анализирани за характеристики, като например хомогенност на дисперсията, с подходящи трансформации на данни, ако е необходимо. Третираните групи следва да бъдат сравнени с контролна група, с използване на техники като ANOVA, следвани от сравняване по двойки (напр. изпитването на Dunnett с едностранна критична област) и критерият за статистическо различие, например,  $p \leq 0,05$ . Тези групи, за които е постигната статистическа значимост, трябва да бъдат идентифицирани. „Относителни тегла на органи“ обаче следва да се избягват, поради невалидността на статистическите допускания, които са в основата на тази обработка на данните.
60. За андрогенен агонизъм контролата следва да бъде изпитваната група само на носител. Характеристиките на начина на действие на даден изпитван химикал могат да доведат до различни относителни отговори при различните тъкани, например тренболон, който не може да бъде 5 $\alpha$ -редуциран, има по-силно изразени ефекти върху LABC и GP, отколкото TP. Статистически значимо увеличение ( $p \leq 0,05$ ) във всеки две или повече от петте прицелни андрогенно зависими тъкани (VP, LABC, GP, CG и SVCG) следва да се счита за положителен резултат за андрогенен агонист, и всички прицелни тъкани следва да показват увеличен растеж в известна степен. Комбинираната оценка на всички отговори на спомагателни тъкани от органи от половата система (ASO) може да се постигне посредством използването на подходящ мултивариантен анализ на данните. Това би могло да подобри анализа, особено в случаите, когато само една тъкан дава статистически значим отговор.
61. За андрогенния антагонизъм контролата следва да бъде изпитваната група на референтен андроген (само тестостерон пропионат). Характеристиките на начина на действие на даден изпитван химикал могат да доведат до различни относителни отговори сред различните тъкани, например инхибитори на 5 $\alpha$ -редуктаза като финастерид, имат по-силно изразени ефекти във вентралния дял на простатата, отколкото в други тъкани, в сравнение с мощен антагонист на AP, като например флутамид. Статистически значимо намаление ( $p \leq 0,05$ ) във всеки две или повече от петте прицелни андрогенно зависими тъкани (VP, LABC, GP, CG и SVCG), свързано единствено с третирането с TP, следва да се счита за положителен резултат за андрогенен антагонист, и всички прицелни тъкани следва да показват намален растеж в известна степен. Комбинираната оценка на всички отговори на спомагателни тъкани от органи от половата система може да се постигне посредством използването на подходящ мултивариантен анализ на данните. Това би могло да подобри анализа, особено в случаите, когато само една тъкан дава статистически значим отговор.
62. Данните следва да се обобщят в таблична форма, съдържаща средна стойност, стандартна грешка от средната стойност (стандартно отклонение също би било приемливо) и размер на извадката за всяка група. Трябва също да бъдат включени таблици с индивидуални данни. Индивидуалните стойности, средната стойност, средната грешка (стандартното отклонение) и стойността на коефициента на вариация за контролните данни следва да бъдат разгледани, за да се определи дали отговарят по допустим начин на критерии за съгласуваност с очаквани стойности от минали периоди. При коефициенти на вариация, които надхвърлят стойностите на CV, изброени в Таблица 1 (вж. параграфи 25 и 26), за всяко тегло на орган следва да се определи дали съществуват грешки в записването или въвеждането на данните, или дали лабораторията все още не е усвоила прецизната дисекция на андрогенно зависимите

тъкани и дали е оправдано допълнително обучение/практика. Като цяло CV (стандартното отклонение, разделено на средното тегло на органа) са възпроизводими от една лаборатория в друга и от едно изследване в друго. Представените данни следва да включват най-малко: вентрален дял на простатата, семенно мехурче, анален повдигач и луковичнопещерист мускул, жлези на Каупър, главичка на пениса, черен дроб, телесно тегло и изменение на телесното тегло от началото на дозирането до аутопсията. Данните също могат да бъдат представени след корекцията на телесното тегло за ковариантност, но това не следва да замества представянето на некоригираните данни. Освен това, ако препуциумът не се отделя при някоя от групите, случаите на отделяне на препуциума следва да бъдат записани и статистически съпоставени с контролната група, с използване на точен тест на Фишер.

63. При проверка за сверяване на точността на въведените компютърни данни спрямо оригиналните данни, стойности за теглото на органите, които не са биологично реалистични или варират с повече от три стандартни отклонения от средните стойности на дадената третирана група, следва да бъдат внимателно проучени и може да се наложи да бъдат пренебрегнати поради вероятни грешки при записването.
  64. Сравнението на резултатите от изследването с коефициенти на вариация по данни на ОИСП (в Таблица 1) често е важна стъпка в тълкуването по отношение на валидността на резултатите от изследването. Данните за минали периоди за контролните групи на носител следва да бъдат запазени в лабораторията. Данните за минали периоди за отговор на положителни референтни химикали, като ТР и FT, също следва да бъдат запазени в лабораторията. Лабораториите могат също така периодично да изпитват отговора на известни слаби андрогенни агонисти и антагонисти и да поддържат тези данни. Тези данни могат да бъдат сравнявани с наличните данни на ОИСП, за да се гарантира, че методите на лабораторията дават достатъчна статистическа прецизност и мощност.
-

## Допълнение 1

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Андрогенен** е термин, използван за описване на положителното влияние върху растежа на андрогенно зависими тъкани.

**Антиандрогенен** е способността на даден химикал да потиска активността на ТР в организъм на бозайник.

**Химикал** означава вещество или смес.

**Дата на раждане** е постнатален ден 0.

**Доза** е прилаганото количество от изпитвания химикал. При биологичното изследване на Hershberger дозата се изразява като маса на изпитвания химикал за единица телесно тегло на изпитваното животно на ден (напр. mg на kg телесно тегло дневно).

**Дозиране** е общо понятие, включващо дозата и честотата и продължителността на нейния прием.

**В терминално състояние** е термин, използван за описание на състоянието на животно, което е умиращо, т.е. в близост до момента на смъртта.

**Постнатален ден X** е X-тият поред ден на живот след датата на раждане.

**Чувствителност** е способността на даден метод за изпитване за правилно идентифициране на химикали, имащи свойството, което е подложено на изпитване.

**Специфичност** е способността на даден метод за изпитване за правилно идентифициране на химикали, нямащи свойството, което е подложено на изпитване.

**Изпитван химикал** е всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

**Валидиране** е научна процедура, планирана за характеризиране на работните изисквания и ограничения на даден метод за изпитване, и за доказване на неговата надеждност и относимост за определена цел.

---

**Бележка:** Документ, изготвен от Секретариата на програмата относно насоките за изпитване въз основа на споразумението, постигнато на 6-тото заседание на Оперативната група по изпитване и оценка на нарушителите на функциите на ендокринната система

**Концептуална рамка на ОИСП за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система**

|                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Равнище 1</b></p> <p>Сортиране и приоритизиране върху съществуваща информация</p>                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>— физични и химични свойства, напр. ММ, реактивоспособност, летливост, биоразграимост</li> <li>— експозиция на човека и окол.среда, напр. обем на производство, изпускания, употреби</li> <li>— опасност, напр. токсикологични данни на разположение</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <p><b>Равнище 2</b></p> <p>Изпитвания <i>in vitro</i> предоставящи механистични данни</p>                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Афинитет за свързване към рецептор ER, AR, TR</li> <li>— Транскрипционно активиране</li> <li>— Ароматаза и стероидогенеза <i>in vitro</i></li> <li>— Разпознаване/свързване към рецептор за арилов вълевод.</li> <li>— QSAR</li> <li>— предскрининг висока производителност</li> <li>— функция на щитовидната жлеза</li> <li>— изследванена хепатоцити от риби (VTG)</li> <li>— други (както е приложимо)</li> </ul>                                                                                                    |
| <p><b>Равнище 3</b></p> <p>Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за отделни ендокринни механизми и ефекти</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>— Утеротрофично изследване (за естрогени)</li> <li>— Изследване на Hershberger (за андрогени)</li> <li>— Хормонална функция, несвързана с хормони</li> <li>— Други (напр. щитовидна жлеза)</li> <li>— изследв. на VTG (вителогенин) от риби (за естрогени)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <p><b>Равнище 4</b></p> <p>Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за множество ендокринни механизми и ефекти</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>— подобрен ОИСП 407 (крайни точки основани на ендокринни механизми)</li> <li>— изследвания на мъжки и женски в пубертет</li> <li>— изследване на невредими полово зрели мъжки</li> <li>— Изсл. гонадна хистопатология при риби</li> <li>— Изследване на метаморфоза при жаби</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                   |
| <p><b>Равнище 5</b></p> <p>Изпитвания <i>in vivo</i> предоставящи данни за ефекти от ендокринни и други механизми</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>— изследване на 1 поколение (TG415 подобр.)<sup>1</sup></li> <li>— изследване на 2 поколения (TG416 подобр.)<sup>1</sup></li> <li>— изп. скрининг на репродукция (TG421 подобр.)<sup>1</sup></li> <li>— комбинирано скринингово изпитване 28 дни/репродукция (TG 422 подобр.)<sup>1</sup></li> <li><sup>1</sup> Потенциални подобрения ще се разглеждат от ГУВб</li> <li>— Изследвания за частичен и пълен жизнен цикъл при риби, птици, земно-водни и безгръбначни (на развиващия се организъм и репродукция)</li> </ul> |

ГУВб: Група за управление на валидирането при изпитване и оценка на бозайници

## БЕЛЕЖКИ КЪМ РАМКАТА

- Бележка 1: Въвеждане на всички равнища и напускане на всички равнища е възможно и зависи от естеството на съществуващите потребности от информация за целите на оценката на опасността и риска.
- Бележка 2: На равнище 5 екотоксикологията следва да включва крайни точки, които дават показания за механизми за вредни ефекти, както и потенциални увреждания на равнище популация
- Бележка 3: Когато даден мултимодален модел покрива няколко от отделните изследвания на крайни точки, този модел следва да замени използването на тези изследвания на крайни точки
- Бележка 4: Оценката на всеки химикал следва да се извършва въз основа на всеки отделен случай, като се взема предвид цялата достъпна информация и като се отчита функцията на равнищата на рамката.
- Бележка 5: Към настоящия момент рамката не следва да се счита за всеобхватна. На равнища 3, 4 и 5 тя включва изследвания, които или са налични, или по отношение на тях е в ход валидиране. Що се отнася до последните, те са включени временно. След като бъдат разработени и валидирани, те ще бъдат официално добавени към рамката.
- Бележка 6: Равнище 5 не следва да се разглежда като включващо само окончателни изпитвания. Счита се, че изпитванията, включени на това равнище, допринасят за общата оценка на опасността и риска.

## ЛИТЕРАТУРА

- (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 № 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 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment № 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 № 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). Ръководство относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 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 № 425.
- (20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment № 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. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <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](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 № 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) Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2010 година относно защитата на животните, използвани за научни цели (ОВ L 276, 20.10.2010 г., стр. 33).
- (27) Следните глави от настоящото приложение:  
Б.1А. Остра орална токсичност — процедура с фиксирани дози  
Б.1Б. Остра орална токсичност — метод клас остра токсичност

#### Б.56 РАЗШИРЕНО ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ТОКСИЧНОСТ ЗА РЕПРОДУКЦИЯТА В ЕДНО ПОКОЛЕНИЕ

##### УВОД

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 443 (2012). Той се основава на предложението на Международния институт за науките за живота (ILSI)-Институт по науките за здравето и околната среда (HESI) и Техническият комитет по оценка на безопасността на агрохимикалите (ACSA) за разширено изследване относно репродукцията в едно поколение в жизнен стадий „първо поред поколение“ ( $F_1$ ), публикувано в Cooper et al., 2006 (1). В планирането на изследването са направени някои подобрения и разяснения, за да се предостави гъвкавост и да се подчертае важността на започването от съществуващите знания, като се използват интравитални наблюдения, които да насочват и приспособяват изпитването. Настоящият метод за изпитване обхваща подробно описание на оперативното извършване на разширено изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение. Настоящият метод за изпитване описва три кохорти животни от първо поред поколение (животни от  $F_1$ ):

Кохорта 1: оценява крайните точки за репродукцията/развиващия се организъм; тази кохорта може да се разшири с оглед да обхване поколение  $F_2$  (второ поред поколение).

Кохорта 2: оценява потенциалното въздействие от експозицията на химикала върху нервната система на развиващия се организъм.

Кохорта 3: оценява потенциалното въздействие от експозицията на химикала върху имунната система на развиващия се организъм.

2. Решенията за това дали да се направи оценка на второто поред поколение и да се пропусне кохортата за токсичност за нервната система на развиващия се организъм и/или кохортата за токсичност за имунната система на развиващия се организъм, следва да отразяват съществуващите познания за подлагания на оценка химикал, както и нуждите на различните регулаторни органи. Целта на метода за изпитване е да предостави подробности за това как може да се извърши изследването и да засегне въпроса как би следвало да бъде оценявана всяка кохорта.
3. Процедурата за решение относно вътрешно задействане с оглед производство на 2-ро поколение е описана в Ръководство № 117 на ОИСП (39) за онези регулаторни органи, които използват условия за вътрешно задействане.

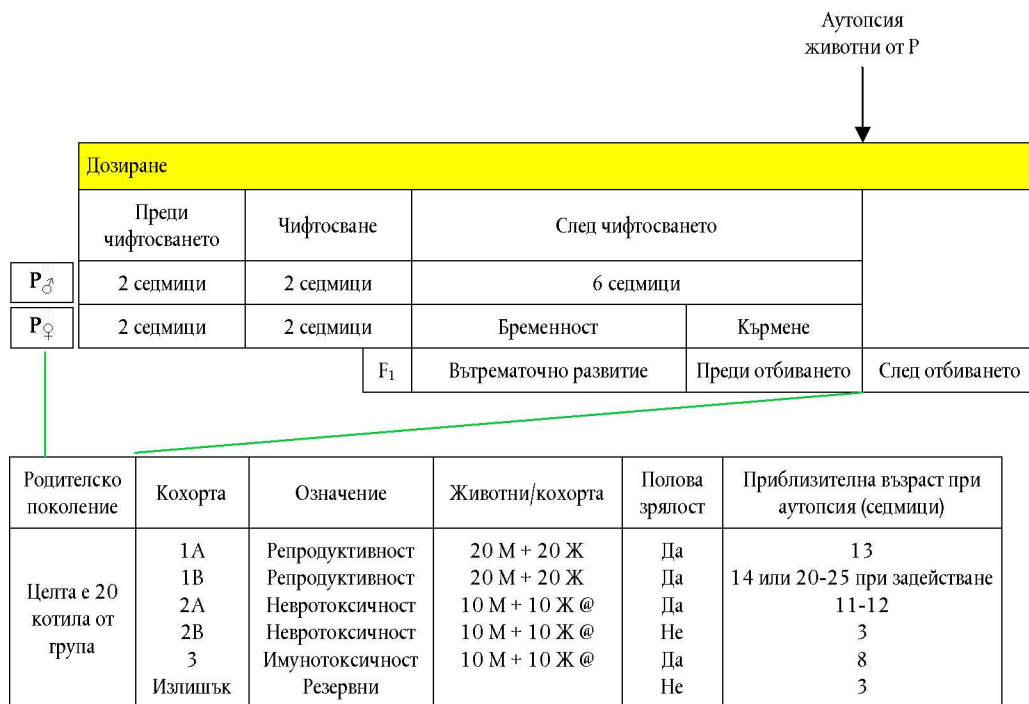
#### ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ЦЕЛИ

4. Основната цел на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение е да оцени специфични жизнени стадии, които не са обхванати от други видове изследвания за токсичност, и извърши изпитване за ефекти, които могат да се проявят в резултат на пренатална и постнатална експозиция на химикали. За крайни точки за репродукцията се предвижда като първа стъпка, и когато има в наличност информация от проучвания с повтаряща се доза (включително скринингови изследвания на токсичност за репродукцията, напр. OECD TG 422 (32), или краткосрочни скринингови изследвания за нарушители на функциите на ендокринната система (например утеротрофично изследване — метод за изпитване Б.54 (36)) и изследване на Hershberger — метод за изпитване В.55 (37), същата да се използва за откриване на ефекти върху репродуктивните органи на мъжки и женски животни. Това може да включва сперматогенеза (хистопатология на тестисите) за мъжките, и естрални цикли, брой фоликули/зреење на овоцити и цялостност (хистопатология) на яйчниците за женските животни. Впоследствие разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение служи за изпитване за крайните точки за репродуктивността, които се нуждаят от взаимодействие на мъжки с женски животни, на женски животни с плода, на женски животни с поколението, и поколение  $F_1$  след полово зрялост (виж Ръководство № 151 на ОИСП в подкрепа на настоящия метод за изпитване (40)).
5. Настоящият метод за изпитване е проектиран да предостави оценка на ефектите на химикали върху пренаталното и постнаталното развитие, както и задълбочена оценка на системната токсичност при бременни и кърмещи женски и младо и полово зряло поколение. От подробното проучване на крайните точки за развиващия се организъм, като например жизнеспособност на потомството, здравословно състояние на новородените, статус на развиващия се организъм при раждане и физическо и функционално развитие до достигане на полово зрялост, се очаква да идентифицира конкретни прицелни органи при потомството. Освен това проучването ще предостави и/или потвърди информация за ефектите на изпитвания химикал върху целостта и функционирането на репродуктивната система при полово зрели мъжки и женски животни. Взети са предвид по-специално, но не само, следните параметри: функция на гонадите, естрален цикъл, зреење на сперматозоидите от епидидима, поведение при чифтосване, зачеване, бременност, раждане и кърмене. Освен това информацията, получена от оценките за невротоксичност и имунотоксичност за развиващия се организъм, ще характеризира потенциалните ефекти върху тези системи. Данните, получени от тези изпитвания, следва да позволят определянето на нивата без наблюдаван неблагоприятен ефект (NOAEL), най-ниските дози, при които се наблюдава неблагоприятен ефект (LOAEL), и/или еталонните дози за различните крайни точки и/или да бъдат използвани за охарактеризиране на ефектите, открити в предишни проучвания с повтаряща се доза и/или да служат като ръководство за последващи изпитвания.
6. На фигура 1 е показан схематичен чертеж на протокола. Изпитваният химикал се прилага непрекъснато в постепенни дози на няколко групи полово зрели мъжки и женски животни. Това родителско поколение (Р) се дозира за определен период преди чифтосването (избран въз основа на наличната информация за изпитвания химикал; но в продължение на най-малко две седмици) и в продължение на двуседмичен период на чифтосване. Мъжките от Р се третират впоследствие най-малко до отбиването на  $F_1$ . Те трябва да се третират в продължение на най-малко 10 седмици. Те могат да бъдат третирани за по-дълъг период, ако има нужда от изясняване на ефектите върху репродукцията. Тритирането на женските животни от Р продължава по време на бременността и кърменето до прекратяването след отбиване на котилата им (т.е. третиране за период от 8—10 седмици). Поколението  $F_1$  се третира по-нататък с изпитвания химикал от отбиването до навършване на полово зрялост. Ако се оценява второ поколение (виж Ръководство № 117 на ОИСП (39), третирането на потомството от  $F_1$  се запазва до отбиването на  $F_2$ , или до прекратяване на изследването.
7. При всички животни се провежда клинично наблюдение и патологоанатомично изследване за установяване на признаци на токсичност, като особено внимание се обръща върху състоянието и функцията на мъжката и женската репродуктивна система и върху здравословното състояние, растежа и развитието на потомството. При отбиване, избрани потомства се разпределят към конкретни подгрупи (коHORTи 1—3, вж. параграфи 33 и 34 и фигура 1) за допълнителни проучвания, включително полово съзряване, цялост и функциониране на репродуктивните органи, неврологични и поведенчески крайни точки и имунни функции.
8. При провеждане на изследването следва да бъдат спазвани ръководните принципи и съображенията, формулирани в Ръководство № 19 на ОИСП относно признаването, оценяването и използването на клинични признаци като хуманен край за опитни животни, използвани за оценка на безопасността (34).

9. Когато са на разположение достатъчен брой изследвания, за да се установи въздействието на този нов план за изследване, методът за изпитване ще бъде прегледан и, ако е необходимо, преразгледан в светлината на придобития опит.

Фигура 1

### Схема на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение



@ по едно от котило и представителни за общо 20 котила където е възможно

### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА/ПОДГОТОВКАТА ЗА ИЗПИТВАНЕТО

#### Животни

##### Избор на вида и породата на животните

10. Изборът на видовете за изпитването за токсичност за репродукцията трябва да бъде внимателно обмислено в съответствие с цялата налична информация. Поради количеството съпътстващи данни и съпоставимостта с изпитванията за обща токсичност обаче плъховете обичайно са предпочитаният вид, и критериите и препоръките, дадени при настоящия метод за изпитване, се отнасят за този вид. Използването на друг животински вид трябва да се обоснове и в тези случаи се налага да се внесат съответни модификации в протокола. Не трябва да се използват породи с ниска плодовитост или породи, за които е характерна висока честота на спонтанните вродени аномалии.

##### Възраст, телесно тегло и критерии за включване

11. Като родители трябва да се използват здрави животни, които в миналото не са били подлагани на опитни процедури. Следва да бъдат изследвани мъжки и женски животни, като женските индивиди следва да не са раждали и да не са бременни. Животните от поколение Р трябва да бъдат в полово зрялост, със сходно тегло в началото на дозирането (в рамките на съответния пол), на подобна възраст (около 90 дни) при чифтосването, и представителни за изследвания вид и порода. Животните следва да бъдат аклиматизирани в продължение на поне 5 дни след пристигането им. Животните се разпределят на случаен принцип към контролните и третираните групи, по начин, който води до съпоставими между групите стойности на средното телесно тегло (т.е.  $\pm 20\%$  от средната стойност).

##### Условия на отглеждане и хранене

12. Температурата в стаята на опитните животни трябва да бъде  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Относителната влажност следва да бъде между 30 и 70 %, с идеален обхват от 50—60 %. Изкуственото осветление следва да бъде настроено на 12 часа светлина, 12 часа тъмнина. Уместно е да се използват конвенционални лабораторни храни при неограничено количество вода за пиене. Особено внимание следва да се обърне на съдържанието на фитоестрогени в хранителния

режим, тъй като високото равнище на фитоестрогени в хранителния режим може да засегне някои крайни точки на репродукцията. Препоръчват се стандартизирани хранителни режими със свободна рецептура, в които естрогенните химикали са намалени (2)(30). Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване с изпитван химикал, когато прилагането му е по настоящия метод. Трябва да бъдат проверени съдържанието, хомогенността и стабилността на изпитвания химикал в хранителния режим. Храната и водата за пиене следва да бъдат редовно анализирани за наличието на замърсители. Проби от всяка партида хранителен режим, използван по време на изпитването, следва да се съхранят при подходящи условия (напр. замразени при температура — 20 °C), до приключването на доклада, в случай че резултатите се нуждаят от допълнителен анализ на съставките на хранителния режим.

13. Животните се настаняват в клетки в малки групи от един и същ пол и третирана група. Те могат да бъдат отглеждани в индивидуални клетки, за да се избегнат евентуалните наранявания (напр. мъжки след периода на чифтосването). Чифтосването трябва да се извършва в клетки, подходящи за тази цел. След като се открият доказателства за копулация женските, за които се предполага, че са бременни, се настаняват отделно в клетки за раждане или майчинство, където им се предоставят подходящи гнездови материали. Котилата се отглеждат с майките им до отбиването. Животните от F<sub>1</sub> се отглеждат в малки групи от един и същ пол и третирана група от отбиването до прекратяването на изследването. Ако това е научно обосновано, животните могат да бъдат отглеждани отделно. Нивото на фитоестрогени, съдържащи се в избраните материали за постилане, следва да бъде минимално.

#### *Брой и идентифициране на животните*

14. Обикновено всяка изпитвана и контролна група трябва да се състои от достатъчен брой чифтосващи се двойки за достигане на най-малко 20 бременни женски животни за подложена на дадена доза група. Целта е да се получат достатъчно на брой бременности, за да се осигури съдържателна оценка на потенциала на химикала да влияе върху плодовитостта, бременността и майчиното поведение при животните от поколение P, както и върху растежа и развитието на потомството от F<sub>1</sub> от зачеването до зрелостта. Недостигането на желан брой бременни животни не означава непременно, че изследването е невалидно, и следва да се оценява за всеки отделен случай, като се има предвид евентуална причинно-следствена връзка с изпитвания химикал.
15. На всяко животно от P се дава уникален идентификационен номер, преди да започне дозирането. Ако лабораторните данни от минали периоди сочат, че е възможно значителен дял женски индивиди да не покажат редовни естрални цикли (4 или 5 дни), тогава преди началото на третирането се препоръчва оценка на естралните цикли. Като алтернатива, размерът на групата може да бъде увеличен, за да се гарантира, че поне 20 женски животни във всяка група ще имат редовни естрални цикли (4 или 5 дни) в началото на третирането. Цялото потомство от F<sub>1</sub> се идентифицира индивидуално при първия преглед на новородените през постнатален ден (ПНД) 0 или 1. В документацията трябва да се обозначи от кое котило произлиза всяко животно от F<sub>1</sub> и, където е приложимо, от F<sub>2</sub>, по време на цялото изследване.

#### **Изпитван химикал**

##### *Налична информация за изпитвания химикал*

16. Прегледът на съществуващата информация е важен за решенията относно пътя на въвеждане, избора на носител, избора на животински вид, избора на дозирането и евентуалните изменения в графика за дозиране. Следователно цялата налична относима информация за изпитвания химикал, т.е. физични, химични, токсикокинетични (включително специфичен за вида метаболизъм), токсикодинамични свойства, зависимости структура-активност (SAR), метаболитни процеси *in vitro*, резултати от предходни изследвания за токсичност и относима информация за структурни аналози следва да бъде взета предвид при планирането на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение. Предварителна информация за абсорбцията, разпределението, метаболизма, екскрецията (APME) и биоаккумуляцията може да се получи от химичната структура, физичните и химичните данни, обхвата на изследванията на свързването с плазмени протеини или токсикокинетиката (ТК), а резултати от изследванията за токсичност дават допълнителна информация, например относно NOAEL, метаболизма или метаболитната индукция.

##### *Вземане предвид на токсикокинетични данни*

17. Въпреки че не се изискват, данните за ТК от извършени в миналото изследвания за определяне на обхвата или други изследвания са изключително полезни при изготвянето на плана на изследването, избирането на нивата на доза и тълкуването на резултатите. От особена полза са данни, които: 1) служат за проверка на експозицията на изпитвания химикал (или относимите метаболити) на развиващите се зародиши и на новородените, 2) предоставят приблизителна оценка на вътрешната дозиметрия, и 3) служат за оценка на потенциално насищане на кинетичните

процеси в зависимост от дозата. Допълнителни данни за ТК, като например метаболитни профили, изменение на концентрацията във времето и т.н. също трябва да бъдат взети под внимание, ако са налични. Допълнителни данни за ТК могат също да се съберат по време на основното изследване, при условие че това не пречи на събирането и тълкуването на крайните точки на основното изследване.

Като обща насока, следният набор от данни за ТК биха били от полза за планиране на разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение:

- Късна бременност (*например*, ден 20 от бременността) — кръв от майката и от плода
- Среда на периода на кърмене (ПНД 10) — кръв от майката и от новороденото и/или мляко
- Ранен период след отбиването (*напр.* ПНД 28) — кръвни проби от отбитото животно

Следва да се прилага гъвкавост при определяне на конкретните определяеми компоненти (*напр.* изходният химикал и/или метаболитите) и схема за вземане на проби. Например, броят на взетите проби и графикът за пробовземане в даден ден ще зависят от пътя на експозиция и предварителното познаване на токсикокинетичните свойства при животни, които не са бременни. За изследвания на хранителни режими пробовземането последователно по едно и също време през всеки от тези дни е достатъчно, докато при дозирането през сонда може да доведе до необходимост от допълнителни времена на пробовземане, за да се получи по-добра приблизителна оценка на обхвата от вътрешни дози. Не е необходимо обаче да се покрива цялото изменение на концентрацията във времето в един отделен ден за пробовземане. Ако е необходимо, кръвта може да се обедини по пол в рамките на дадено котило за анализите на плода и новородените.

#### *Път на прилагане*

18. Изборът на път следва да отчита пътя или пътищата, които са относими в най-голяма степен към експозицията на човека. Въпреки че протоколът е проектиран за прилагане на изпитвания химикал чрез хранителен режим, той може да се модифицира за прилагане по други пътища (питейна вода, сонда, вдишване, през кожата), в зависимост от характеристиките на химикала и изискваната информация.

#### *Избор на носител*

19. Когато е необходимо, изпитваният химикал е в разтвор или в суспензия в подходящ носител. Препоръчва се, когато е възможно, най-напред да се прецени дали може се използва воден разтвор/суспензия, след това да се прецени за разтвор/емулсия в масло (*напр.* царевично олио). Когато се използват други носители освен водата, трябва да се познават токсикологичните свойства на носителите. Използването на носители с потенциална действителна токсичност трябва да се избягва (*напр.* ацетон, диметилсулфоксид). Трябва да бъде определена стабилността на изпитвания химикал в носителите. Когато за улесняване на дозирането се използва носител или друга добавка, следва да се вземат предвид следните характеристики: ефекти върху абсорбцията, разпределението, метаболизма или задържането на изпитвания химикал; ефекти върху химичните свойства на изпитвания химикал, които могат да изменят токсикологичните му характеристики; и ефекти върху консумирането на храна или вода, или хранителния статус на животните.

#### *Избор на доза*

20. Обикновено изследването трябва да включва поне три нива на доза и една паралелна контрола. При избора на подходящи нива на доза, изследователят трябва да вземе под внимание цялата налична информация, включително информация за дозиране от предходни изследвания, данни от ТК от бременни животни и от животни, които не са бременни, степен на прехвърляне чрез млякото, и приблизителна оценка на експозицията на човека. Ако има налични данни от ТК, които показват насищане на кинетичните процеси в зависимост от дозата, следва да се положат грижи да се избегнат високи нива на доза, които ясно демонстрират насищане, при условие, разбира се, че се очаква експозицията на човека да е доста под точката на насищане. В такива случаи най-високото ниво на доза трябва да бъде на инфлексната точка за преминаване към нелинейно ТК поведение, или съвсем малко над нея.
21. В отсъствието на относими данни от ТК, нивата на доза следва да се основават на токсичните ефекти, освен ако няма ограничение, свързано с физическите и химическите свойства на изпитвания химикал. Ако нивата на доза се основават на токсичност, най-високата доза следва да бъде подбрана така, че да предизвика някаква системна токсичност, но не смърт или тежко страдание на животните.
22. Следва да се подберат нива на доза в намаляваща последователност с цел установяване на всеки един ефект, свързан с дозата, както и да се установят NOAEL или дозите в близост до границата на откриване, с което ще се даде възможност за определяне на еталонна доза за най-чувствителната крайна точка или точки. Често двукратните или четирикратните интервали са оптимални с оглед избягване на големи интервали на дозите между NOAEL и LOAEL. Добавянето на четвърта изпитвана група често е за предпочитане пред използването на много голям интервал (*напр.* повече от 10-кратен) между дозите.

23. С изключение на третиране с изпитвания химикал, животните в контролната група се отглеждат по начин, идентичен на този при животните от изпитвана група. Животните от тази група следва да не се третират, или да им се провежда фиктивно третиране, или това да е контролна група на носител, когато се използва такъв при прилагането на изпитвания химикал. Когато се използва носител, той следва да се въвежда на животните от контролната група в най-голямото използвано количество.

#### *Изпитване при пределна концентрация*

24. Ако при изследвания с повтаряща се доза няма показания за токсичност при доза от поне 1 000 mg/kg телесно тегло/ден, или ако не се очаква токсичност, изхождайки от данните за структурно и/или метаболитно свързани химикали, показващи сходство в метаболитните свойства *in vivo/in vitro*, може да не е необходимо изследване, използващо няколко нива на доза. В такива случаи разширеното изпитване за токсичност за репродукцията в едно поколение може да се извърши с използване на контролна група и еднократна доза от поне 1 000 mg/kg телесно тегло/ден. Ако обаче при тази пределна доза бъдат намерени доказателства за токсичност за репродукцията или за развиващия се организъм, за идентифицирането на NOAEL ще са необходими допълнителни изследвания при по-ниски нива на доза. Тези съображения за изпитване при пределна концентрация се прилагат само когато експозиция на човека не показва необходимостта от по-високо ниво на доза.

#### ПРОЦЕДУРИ

##### **Експозиция на потомството**

25. Експозицията чрез хранителния режим е предпочитаният метод за прилагане. При изследване чрез сонда следва да се отбележи, че новородените обикновено са експонирани на изпитвания химикал само индиректно чрез майчиното мляко до отбиването им, когато за тях започва директното дозиране. При изследване чрез хранителния режим или питейната вода новородените получават допълнително изпитвания химикал и директно, когато започнат да се хранят самостоятелно през последната седмица от периода на кърмене. Следва да бъдат разгледани изменения на плана на изследването, ако екскрецията на изпитвания химикал чрез млякото е слаба и когато липсват доказателства за непрекъсната експозиция на потомството. В тези случаи следва да се разгледа директно дозиране през периода на кърмене въз основа на наличната информация за ТК, токсичността за потомството или измененията в биомаркерите (3)(4). Преди провеждането на изследвания за директно дозиране на новородени в периода на кърмене следва внимателно да се разгледат предимствата и недостатъците (5).

##### **График на дозирането и прилагане на дозите**

26. Известна информация за естралния цикъл, хистопатологията на мъжката и женската репродуктивна система и анализа на състоянието на сперматозоидите от тестисите/епидидима може да е налична от предходни изследвания за токсичност с повтаряща се доза с подходяща продължителност. Следователно продължителността на третирането през времето преди чифтосването в разширеното изпитване за токсичност за репродукцията в едно поколение е насочена към откриване на ефектите върху функционалните промени, които могат да попречат на поведението при чифтосване и на оплождането. Третирането през времето преди чифтосването следва да бъде достатъчно дълго, за да се постигнат условия на стационарно състояние при експозиция на мъжките и женските животни от Р. В повечето случаи 2-седмично третиране през времето преди чифтосването и за двата пола се счита за подходящо. За женските това обхваща 3-4 пълни естрални цикъла и следва да е достатъчно за откриване на всякакви неблагоприятни ефекти върху цикличността. За мъжките това се равнява на времето, необходимо за преминаването на узряващите сперматозоиди през епидидима и следва да позволява откриване на пост-тестикларни ефекти върху сперматозоидите (през последните етапи от напускането на клетките на Сертоли и узряването на сперматозоидите в епидидима) при чифтосване. Към момента на прекратяване, когато по график са планирани хистологията на тестисите и епидидима и анализът на параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите, мъжките от Р и F<sub>1</sub> вече ще са били експонирани в продължение най-малко на един процес на сперматогенеза ((6)(7)(8)(9) и Ръководство № 151 на ОИСР (40)).
27. Сценариите на експозиция през времето преди чифтосването за мъжките животни могат да бъдат адаптирани, ако в предходни изследвания са били ясно показани тестикларна токсичност (нарушаване на сперматогенезата) или ефекти върху целостта и функционирането на сперматозоидите. По подобен начин, за женските животни, известни въздействия на изпитвания химикал върху естралния цикъл и следователно върху способността за чифтосване, могат да оправдават различни сценарии на експозиция през времето преди чифтосването. В специални случаи може да се допусне третиране на женски животни от Р да започне само след получаване на положителна нативка за сперматозоиди (вж. Ръководство № 151 на ОИСР (40)).
28. След като е установен периодът на дозиране през времето преди чифтосването, животните следва да бъдат третирани с изпитвания химикал непрекъснато 7 дни в седмицата до аутопсията. Дозирането на всички животни трябва да се извършва по един и същ метод. Дозирането следва да продължи по време на 2-седмичния период на чифтосване, а за женски животни от Р — по време на бременността и кърменето до деня на прекратяване след отбиването. Мъжките животни трябва да бъдат третирани по същия начин до прекратяването в момента, в който животните от F<sub>1</sub> бъдат отбити. За аутопсия следва да се дава приоритет на женски животни, които следва да бъдат подложени на аутопсия на същия/подобен ден от периода на кърмене. Аутопсията на мъжки може да се разпростре

върху по-голям брой дни в зависимост от лабораторните съоръжения. Освен ако вече е започнато през периода на кърмене, директното дозиране на избраните мъжки и женски животни от  $F_1$  следва да започне при отбиването и да продължи до деня на аутопсията по график, в зависимост от разпределението на кохортата.

29. За химикали, които се прилагат чрез хранителен режим или вода за пиене, е важно да се гарантира, че количеството изпитван химикал не пречи на нормалното хранене и водния баланс. Когато изпитваният химикал се прилага чрез хранителен режим, могат да бъдат използвани постоянна хранителна концентрация (ppm) или постоянно ниво на доза спрямо телесното тегло на животното; използваната алтернатива трябва да бъде посочена.
30. Когато изпитваният химикал се прилага чрез сонда, обемът на течността, приложен наведнъж, обикновено не следва да превишава 1 ml/100 g телесно тегло (0,4 ml/100 g телесно тегло е максималната стойност за масло, напр. царевично масло). Варирането в обема трябва да бъде сведено до минимум, като концентрацията се приспособи с оглед гарантиране на постоянен обем при всички нива на доза, с изключение на химикали с дразнещо или корозивно действие, тъй като ефектът им обикновено се засилва при по-високи концентрации. Третирането следва да се прилага по едно и също време всеки ден. Дозата за всяко животно следва обикновено да се основава на най-актуалното измерване на индивидуалното телесно тегло и да се коригира най-малко веднъж в седмицата при половозрели мъжки и половозрели женски, които не са бременни, и на всеки два дни при бременните женски и животните от  $F_1$ , когато се прилага преди отбиването и в продължение на 2-те седмици след отбиването. Ако данни от ТК сочат слабо преминаване на изпитвания химикал през плацентата, може да се наложи дозата през сонда през последната седмица на бременността да бъде коригирана, за да се предотврати прилагането на прекалено токсична доза за майката. В деня на раждането женските индивиди следва да не бъдат третирани със сонда или по друг начин, изискващ манипулиране с животното; пропускането на прилагането на изпитвания химикал през този ден е за предпочитане пред смущаването на процеса на раждане.

#### Чифтосване

31. Всяка женско животно от Р трябва да бъде поставено с едно избрано на случаен принцип и несвързано с него мъжко животно от същата група на определена доза (чифтосване 1:1) докато бъдат наблюдавани доказателства за копулация или до изтичането на 2-седмичен срок. Ако няма достатъчно мъжки, например поради смъртност при мъжките преди чифтосването, тогава мъжко животно (или животни), което вече е било чифтосвано, може да бъде чифтосано (1:1) с второ женско животно (или животни), така че всички женски животни да бъдат чифтосани. Денят, в който се установи доказателство за чифтосване (наличие на вагинална запушалка или сперматозоиди), се определя като ден 0 от бременността. Животните следва да бъдат разделени възможно най-скоро след наблюдаването на доказателства за копулация. Ако не е извършено чифтосване след 2 седмици, животните следва да бъдат разделени без допълнителна възможност за чифтосване. Животните от всяка двойка, определена за чифтосване, трябва да бъдат ясно идентифицирани в данните от изпитването.

#### Брой на животните в котилото

32. През ден 4 след раждането броят на животните във всяко котило може да бъде коригиран посредством елиминиране на излишните новородени животни чрез подбор на случаен принцип, за да се получат, колкото е възможно по-точно, пет мъжки и пет женски животни в котило. Избирателното елиминиране на новородени животни, например въз основа на телесно тегло, не е уместно. Когато броят на мъжките или женските новородени животни не дава възможност да се получат по пет животни от пол за котило, приемлива е частична корекция (например, шест мъжки и четири женски животни).

#### Подбор на новородени за изследвания след отбиването (вж. фигура 1)

33. В деня на отбиването (около ПНД 21) до 20 новородени за доза и за контролна група се подбират от всички налични котила за допълнителни проучвания, и се съхраняват до половозряване (освен ако не се изисква провеждане на изпитване на по-ранен етап). Новородените се избират на случаен принцип, с изключение на това, че очевидно малорасли животни (животни с телесно тегло повече от две стандартни отклонения под средното тегло на новородените от съответното котило) следва да не бъдат включвани, тъй като е малко вероятно те да са представителни за третираната група.

През ПНД 21 избраните новородени от  $F_1$  се разпределят на случаен принцип в една от трите кохорти животни, както следва:

Кохорта 1 (1А и 1Б) = изпитване за токсичност за репродукцията/за развиващия се организъм

Кохорта 2 (2А и 2Б) = изпитване за невротоксичност за развиващия се организъм

Кохорта 3 = изпитване за имунотоксичност за развиващия се организъм

Кохорта 1А: Едно мъжко и едно женско животно от котило на група (20/пол/група): приоритетен подбор за първична оценка на ефектите върху репродуктивните системи и на общата токсичност.

Кохорта 1Б: Едно мъжко и едно женско животно от котило на група (20/пол/група): приоритетен подбор за последваща оценка на репродуктивността чрез чифтосване на животни от  $F_1$ , когато се оценяват (виж Ръководство № 117 на ОИСП (39)), и за получаване на допълнителни хистопатологични данни в случаи на предполагаеми токсични за репродукцията химикали или нарушители на функциите на ендокринната система, или когато резултатите от кохорта 1А са неясни.

Кохорта 2А: Общо 20 новородени от група (10 мъжки и 10 женски животни от група; едно мъжко или едно женско от котило) за невropоведенческо изпитване, последвано от оценка на неврохистопатологията като полово зрели животни.

Кохорта 2Б: Общо 20 новородени от група (10 мъжки и 10 женски животни от група; едно мъжко или едно женско от котило) за оценка на неврохистопатологията при отбиване (ПНД 21 или ПНД 22). Ако няма достатъчен брой животни, следва да се отдава предпочитание на разпределението на животни към Кохорта 2А.

Кохорта 3: Общо 20 новородени от група (10 мъжки и 10 женски животни от група; едно от котило, където е възможно). Възможно е да са необходими допълнителен брой новородени от контролната група, за да послужат като животни за положителни контроли в изследването за зависимост от Т-клетки отговор чрез образуване на анти-тела (TDAR) през ПНД  $56 \pm 3$ .

34. Ако няма достатъчен брой новородени в дадено котило, които да служат за всички кохорти, с предимство се ползва Кохорта 1, тъй като тя може да бъде разширена за производство на поколение  $F_2$ . Допълнителни новородени могат да бъдат разпределени в някоя от кохортите в случай на специфични опасения, например ако за даден химикал се предполага, че е невротоксичен, имунотоксичен или токсичен за репродукцията. Тези новородени могат да бъдат използвани за изследвания на различни времеви точки или за оценка на допълнителни крайни точки. Новородени, които не са разпределени по кохорти, се предоставят за клинична биохимия (параграф 55) и макроскопска аутопсия (параграф 68).

#### **Второ чифтосване на животните от поколение Р**

35. Второ чифтосване обикновено не се препоръчва за животните от поколение Р, тъй като то се извършва за сметка на загуба на важна информация за броя на местата на имплантация (и по този начин на данни за пост-имплантацията и перинаталните загуби, показатели за евентуален тератогенен потенциал) за първото котило. Необходимостта от проверка или изясняване на ефекта върху експонираните женски би била удовлетворена по-добре чрез разширяване на обхвата на изследването с оглед включване на чифтосването на поколение  $F_1$ . Второ чифтосване на мъжки животни от Р с нетретираните женски обаче винаги е възможен вариант за изясняване на неясни находки или за по-нататъшно характеризиране на ефектите върху плодовитостта, наблюдавани при първото чифтосване.

#### **ИНТРАВИТАЛНИ НАБЛЮДЕНИЯ**

##### **Клинични наблюдения**

36. На животните от Р и избраните животни от  $F_1$  веднъж дневно се извършва общо клинично наблюдение. В случай на дозиране чрез сонда клиничните наблюдения следва да бъдат извършвани преди и след дозирането (за възможни признаци на токсичност, свързани с върхова концентрация в плазмата). Трябва да се запишат съответните изменения в поведението, признаците на трудно или удължено раждане, както и всички признаци на токсичност. Наблюдаването на всички животни за наличие на силна токсичност, заболяемост и смъртност се извършва два пъти дневно, а през двата неработни дни в края на седмицата — веднъж дневно.
37. В допълнение веднъж седмично се извършва по-задълбочен преглед на всички животни от Р и  $F_1$  (след отбиването), като извършването би било удобно при претегляне на животното, което би svelo до минимум стреса от манипулирането. Наблюденията следва да се провеждат и описват внимателно, с използване на точкови системи, определени от лабораторията, извършваща изпитванията. Трябва да бъде направено усилие да се осигурят минимални колебания в условията на изпитването. Отбелязваните признаци следва да включват промяна в кожата, козината, очите, лигавиците, поява на секрети и екскрети, както и автономна активност (напр. сълзене, пилоерекция, промяна в големината на зениците, необичаен начин на дишане), без да се ограничават до това. Следва да се записват също и изменения в походката, стойката и реакцията при боравене, както и наличието на клонични или тонични движения, стереотипно (например прекомерно поддържане на външния вид, повтарящо се обикаляне в кръг) или необичайно поведение (например самоосакатяване, вървене назад).

**Телесно тегло и консумация на храна/вода**

38. Животните от Р се претеглят на първия ден от дозирането, а след това най-малко веднъж седмично. В допълнение, женските животни от Р се претеглят по време на кърменето в същите дни, когато се претеглят новородените в техните котила (вж. параграф 44). Всички животни от  $F_1$  се претеглят индивидуално при отбиване (ПНД 21) и поне веднъж седмично след това. Телесно тегло се записва също така в деня, в който те достигнат пубертет (приключване на отделянето на препуциума или настъпване на отвореното състояние на вагината). Всички животни се претеглят при умъртвяването.
39. По време на изследването консумацията на храна и вода (в случай на прилагане на изпитвания химикал чрез питейната вода) се записва поне веднъж седмично в същите дни, в които се измерва телесното тегло на животните (с изключение на времето на съвместно обитаване). Консумацията на храна във всяка клетка с животни от  $F_1$  се записва всяка седмица, като се започва от разпределянето в съответната кохорта.

**Естрални цикли**

40. Предварителна информация относно свързани с изпитвания химикал ефекти върху естралния цикъл може вече да е налична от предходни изследвания за токсичност с повтаряща се доза, и може да се използва при планирането на специфичен за изпитвания химикал протокол за разширеното изпитване за токсичност за репродукцията в едно поколение. Обикновено оценката на естралната цикличност (чрез вагинална цитология) започва в началото на периода на третиране и продължава до потвърждение на чифтосването или до края на 2-седмичния период на чифтосване. Ако женските животни са били проверени за нормален естрален цикъл преди третирането, тогава е полезно натривките да продължат след започване на третирането, но в случай че възникне съмнение относно неспецифични ефекти в началото на третирането (като например първоначално явно намаляване на консумацията на храна) на животните може да се позволи приспособяване към третирането за период до две седмици преди началото на 2-седмичния период с натривки, водещ до чифтосване. Ако периодът на третиране на женските е удължен по този начин (т.е. 4-седмично третиране преди чифтосването), следва да бъде разгледано закупуване на животни на по-малка възраст и удължаване на периода третиране на мъжките преди чифтосване. Вземането на клетки от влагалището/цервикса следва да бъде внимателно, за да се избегне увреждане на лигавицата и последващо индуциране на псевдобременност (10)(11).
41. След началото на отвореното състояние на вагината вагиналните натривки трябва да се изследват ежедневно при всички женски животни от  $F_1$  в кохорта 1А, до записване на първото вроговяване, с цел да се определи времеви интервал между тези две събития. Естралните цикли при всички женски животни от  $F_1$  в кохорта 1А следва също да бъдат наблюдавани през период от две седмици, започващ около ПНД 75. Освен това, в случай че чифтосването между животни от поколение  $F_1$  е необходимо, вагиналната цитология при кохорта 1Б се следи от момента на чифтосването до откриването на доказателства за копулация.

**Чифтосване и бременност**

42. В допълнение към стандартните крайни точки (напр. телесно тегло, консумация на храна, клинични наблюдения, включително проверки за смъртност/заболеваемост) се записват датите на чифтосване, датата на осеменяване и датата на раждане и се изчисляват интервалът преди копулацията (от чифтосването до осеменяването) и продължителността на бременността (от осеменяването до раждането). Женските животни от Р трябва да бъдат внимателно прегледани по времето на очакваното раждане за наличие на признаци на трудно раждане. Всякакви отклонения в поведението при гнезденето или кърменето следва да се записват.
43. Датата на настъпване на раждането за майката е ден 0 от кърменето (ДК 0), а за потомството — постнатален ден 0 (ПНД 0). Като алтернатива, всички сравнения могат също да се основават на времето след чифтосването, за отстраняване на невъзможността за разграничаване на данните за постнаталното развитие поради разликите в продължителността на бременността; въпреки това, времето на раждането също трябва да бъде записано. Това е особено важно, когато изпитваният химикал оказва влияние върху продължителността на бременността.

**Показатели за потомството**

44. Всяко котило трябва да бъде прегледано възможно най-скоро след раждането (ПНД 0 или 1), за да се установи броят и полът на новородените, броят на мъртвородените и на живите, както и наличието на макроскопски аномалии (видими външно аномалии, включително вродена цепка на небцето; подкожни кръвоизливи; отклоняващ се от нормата цвят или строеж на тъканта на кожата; наличие на пъпна връв; липса на мляко в стомаха; наличие на изсушени секрети). Освен това, първият клиничен преглед на новородените следва да включва качествена оценка на телесната температура, състоянието на активността и реакцията на манипулиране. Намерените мъртви новородени в ПНД 0 или по-късно следва да бъдат прегледани за възможни дефекти и причина за смъртта. Живите новородени се изброяват и индивидуално се измерва теглото им в ПНД 0 или ПНД 1, и на редовни интервали след това, например в ПНД 4, 7, 14, и 21. Клиничните прегледи, както е приложимо в зависимост от възрастта на животните, трябва да се повтарят при претеглянето на потомството или по-често, ако са направени конкретни за

дадения случай констатации при раждането. Отбелязваните симптоми могат да включват външни аномалии, изменения в кожата, козината, очите, лигавиците, появяване на секрети и екскрети и автономна активност, но без да се ограничават само до това. Следва да се записват също и изменения в походката, стойката и отговора при манипулиране, както и наличието на клонични или тонични движения, стереотипно или необичайно поведение.

45. Разстоянието между ануса и половите органи (РАПО) на всяко новородено животно трябва да бъде измерено най-малко веднъж от ПНД 0 до ПНД 4. Телесното тегло на новороденото следва да бъде измерено в деня на измерване на РАПО, и стойността на РАПО следва да бъде нормализирана към размера на новороденото, за предпочитане към кубичния корен от телесното тегло (12). Наличието на мамили/ареоли у мъжките новородени трябва да бъде проверено през ПНД 12 или 13.
46. Всички избрани животни от  $F_1$  се оценяват ежедневно за отделяне на препуциума или отворено състояние на влагалището съответно за мъжките/женските, като се започне преди очаквания ден за постигането на тези крайни точки, за да се открие ако половото съзряване настъпва рано. Всякакви аномалии в половите органи, като персистиращо влакнесто образуване във влагалището (persistent vaginal thread), хипоспадия (или цепка на пениса), следва да се отбелязват. Полова зрялост на животните от  $F_1$  се сравнява с физическото развитие чрез определяне на възрастта и телесното тегло при отделянето на препуциума или отвореното състояние на влагалището съответно за мъжките/женските (13).

#### **Оценка на потенциалната невротоксичност за развиващия се организъм (коHORTи 2А и 2Б)**

47. За оценките на невротоксичността следва да се използват десет мъжки и 10 женски животни от коHORTа 2А и 10 мъжки и 10 женски животни от коHORTа 2Б от всяка третирана група (за всяка коHORTа: 1 мъжко или 1 женско от котило; всички котила се представляват от най-малко по 1 новородено; избрани на случаен принцип). Животните от коHORTа 2А трябва да бъдат подложени на изпитване чрез интензивни слухови стимули, батерия от функционални изпитвания, двигателна активност (вж. параграфи 48—50) и оценки на невропатологията (вж. параграфи 74—75). Следва да се положат усилия, за да се гарантира, че колебанията във всички условия на изпитването са минимални и не са систематически свързани с третирането. Между променливите, които могат да повлияят върху поведението, са равнището на шума (напр. периодичен шум), температура, влажност, осветление, миризми, време от деня и свързани с околната среда причини за разсейване. Резултатите от изследванията за невротоксичност трябва да се тълкуват във връзка с подходящи контролни референтни обхвати от минали периоди. Животните от коHORTа 2Б следва да се използват за оценка на невропатологията през ПНД 21 или ПНД 22 (вж. параграфи 74—75).
48. Изпитването чрез интензивни слухови стимули трябва да се извърши през ПНД 24 ( $\pm 1$  ден), с използването на животни от коHORTа 2А. Денят на изпитването следва да бъде балансиран между третираните и контролните групи. Всяка сесия се състои от 50 опита. При извършването на изпитването чрез интензивни слухови стимули следва да се определи средната амплитуда на отговора за всеки блок от 10 опита (5 блока от 10 опита), при оптимизирани с оглед привикване по време на сесиите условия на изпитването. Тези процедури трябва да съответстват на метод за изпитване В.53 (35).
49. В подходящ момент между ПНД 63 и ПНД 75, животните от коHORTа 2А се подлагат на батерия от функционални изпитвания и автоматизирано изпитване на двигателната активност. Тези процедури трябва да съответстват на методи за изпитване Б.43 (33) и В.53 (35). Батерията от функционални изпитвания включва пълно описание на външния вид, поведението и функционалната цялост на субекта. Това се оценява чрез наблюдения в клетката, която обитава животното, след изваждането му оттам — в стандартизирана арена за наблюдение (на открито), където животното се придвижва свободно, както и чрез изпитвания с манипулиране. Изпитванията трябва да се провеждат от най-малко интерактивното към най-интерактивното. Списък с мерки е представен в приложение 1. Всички животни следва да бъдат наблюдавани внимателно от обучени наблюдатели, които не са запознати с третирането на животните, с използване на стандартни процедури с оглед свеждане до минимум на варирането между различните наблюдатели. Когато е възможно, е препоръчително един и същ наблюдател да оценява животните в дадено изпитване. Ако това не е възможно, се изисква демонстриране на надеждността при резултатите между различните наблюдатели. За всеки параметър в батерията от поведенчески изпитвания следва да се използват категорично определени мащаби и критерии за използване на точкови системи. Ако е възможно, следва да бъдат разработени обективни количествени мерки за наблюдаваните крайни точки, включващи субективно класиране. Всяко животно се изпитва поотделно за двигателна активност. Провеждането на изпитвателната сесия следва да бъде с достатъчна продължителност, за да се докаже привикване по време на провеждането за контролите. Двигателната активност трябва да се наблюдава посредством автоматичен апарат за записване на активността, способен да улови и пониженията, и повишенията в активността (т.е. базовата активност, измервана от апарата, не следва да бъде с толкова ниска стойност, че да изключва възможността за откриване на пониженията, нито с толкова висока, че изключва откриване на повишенията на активността). Всяко устройство следва да бъде изпитвано чрез стандартни процедури, за да се гарантира, доколкото е възможно, надеждността на работата при различните уреди и в различните дни. Доколкото е възможно, третираните групи трябва да бъдат балансирани между устройствата. Групите за третиране следва да бъдат балансирани по време на изпитването по такъв начин, че да се избегне невъзможност за разграничаване от циркадните ритми на активност.
50. Ако съществуващата информация показва необходимостта от други функционални изпитвания (напр. сензорно, социално, когнитивно), те трябва да бъдат интегрирани, без да се излага на риск целостта на другите оценки, извършени при изследването. Ако това изпитване се извършва със същите животни, използвани за стандартното изпитване чрез интензивни слухови стимули, батерията от функционални изпитвания и изпитването на двигателната

активност, различните изпитвания следва да се планират в графика по такъв начин, че да се сведе до минимум рискът от нарушаване на целостността на тези изпитвания. Допълнителни процедури могат да бъдат особено полезни, когато при емпиричните наблюдения, очакваните ефекти, или различни аспекти, свързани с механизма/начина на действие има показания за специфичен тип невротоксичност.

#### **Оценка на потенциалната имунотоксичност за развиващия се организъм (кохорта 3)**

51. През ПНД 56 ( $\pm$  3 дни) 10 мъжки и 10 женски животни от кохорта 3 от всяка третирана група (1 мъжко или 1 женско от котило; всички котила се представляват от най-малко по 1 новородено; избрани на случаен принцип) следва да бъдат използвани в изследване за зависимост от Т-клетки отговор чрез образуване на антитела, т.е. първичният отговор с IgM-антитела на зависимост от Т-клетки антиген, като SRBC (червени кръвни клетки от овце) или KLN (хемоцианин от *Megathura crenulata*), в съответствие с актуалните процедури за изпитванията за имунотоксичност (14)(15). Отговорът може да бъде оценен чрез отчитане на специфични плакообразуващи клетки (PFC) в далака или чрез определяне на титъра на SRBC-специфични или KLN-специфични IgM-антитела в серум чрез ELISA, във върховата стойност на отговора. Върховата стойност на отговора се получава обикновено четири (отговор чрез PFC) или пет (ELISA) дни след интравенозната имунизация. Ако първичният отговор с антитела се изследва чрез преброяване на плакообразуващи клетки е допустимо да се оценяват подгрупи от животни в различни дни, при условие: че имунизациите и умъртвяването на подгрупите се определят във времето по такъв начин, че PFC да бъдат отчитани във върховата стойност на отговора; че подгрупите съдържат равен брой мъжко и женско потомство от всички групи на определена доза, включително контролните; и че подгрупите се оценяват на приблизително същата постнатална възраст. Експозицията на изпитвания химикал продължава до деня преди започване на събирането на далаците (за отговор чрез PFC) или серума (за изпитване с ELISA).

#### **Последваща оценка на потенциалната токсичност за репродукцията (кохорта 1Б)**

52. Третирането на животните от кохорта 1Б може да бъде поддържано след ПНД 90 и, ако е необходимо, същите могат да бъдат отглеждани за производство на поколение F<sub>2</sub>. Мъжките и женските животни от същата група на определена доза трябва да бъдат поставени да съжителстват (като се избягва чифтосване между животни от едно и също котило) за максимален период от две седмици, започващ на ПНД 90 или след това, но не след ПНД 120. Процедурите следва да бъдат сходни на тези за животните от поколение Р. Въпреки това, въз основа на оценка на значимостта на доказателствения материал, може да е достатъчно за умъртвяване на котилата на ПНД 4, вместо изследването им до отбиването или след него.

#### **НАБЛЮДЕНИЯ ПРИ ПРЕКРАТЯВАНЕТО**

##### **Клинична биохимия/хематология**

53. Системните ефекти трябва да бъдат наблюдавани при животните от поколение Р. При прекратяването се вземат кръвни проби на гладно от определено място от десет избрани по случаен начин мъжки и женски животни от Р на група на определена доза, съхраняват се при подходящи условия и се подлагат на частични или пълни хематологични и клинични биохимични изследвания на T4 и TSH, или други прегледи, предложени въз основа на извесните ефекти от профила на изпитвания химикал (вж. Ръководство № 151 на ОИСП (40)). Следва да бъдат изследвани следните хематологични параметри: хематокрит, концентрация на хемоглобина, брой на еритроцитите, общ и диференциален брой левкоцити, брой на тромбоцитите, както и измерване на времето на съсирване/потенциала за съсирване на кръвта. Изследванията на плазма и серум следва да включват: глюкоза, общ холестерол, уреа, креатинин, общо белтъци, албумин и поне два ензима, показателни за хепатоцелуларни ефекти (като аланин, аминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, алкална фосфатаза, гама-глутамилтранспептидаза и сорбитолдехидрогеназа). Определянето на допълнителни ензими и жлъчни киселини може да даде полезна информация при определени обстоятелства. Освен това кръв от всички животни може да бъде вземана и съхранявана за евентуален анализ на по-късен етап, за да допринесе за изясняване на неясни ефекти или да генерира данни за вътрешна експозиция. Ако не се предвижда второ чифтосване на животните от поколение Р, кръвните проби се вземат непосредствено преди процедурата при планираното умъртвяване, или като част от нея. В случай на съхраняване на животните, кръвните проби се вземат няколко дни преди животните да бъдат чифтосани повторно. Освен ако съществуващи данни от изследвания с повтаряща се доза показват, че параметърът не е засегнат от изпитвания химикал, анализът на урина следва да се извършва преди прекратяването, като се оценяват следните параметри: външен вид, обем, осмолалност или относителна плътност, рН, общо белтъци и глюкоза, кръв и кръвни клетки, клетъчни остатъци. Урина също може да бъде вземана за наблюдаване на екскрецията на изпитвания химикал и/или метаболит(и).
54. Системните ефекти трябва също да бъдат наблюдавани при животните от поколение F<sub>1</sub>. При прекратяването се вземат кръвни проби на гладно от определено място от десет избрани по случаен начин мъжки и женски животни от кохорта 1А на група на определена доза, съхраняват се при подходящи условия и се подлагат на стандартни клинични биохимични изследвания, включително оценка на серумните нива на тироидни хормони (T4 и TSH), хематология (общ и диференциален брой левкоцити и брой на еритроцитите) и оценки на анализа на урина.

55. Излишъкът от новородени животни в ПНД 4, се подлагат на макроскопска аутопсия и се обръща внимание на измерването на концентрациите на серумен тиреоиден хормон (Т4). Ако е необходимо, кръвта от новородените (ПНД 4) може да бъде обединена по котила за анализи на биохимия/тиреоиден хормон. Кръвта се събира също така и за анализ на Т4 и TSH от животни след отбиването, подложени на макроскопска аутопсия през ПНД 22 (новородени от поколение F<sub>1</sub>, които не са разпределени по кохорти).

#### Параметри за оценка на състоянието на сперматозоидите

56. Параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите се измерват във всички мъжки индивиди от поколение Р, освен ако няма данни, които да показват, че параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите не са засегнати при 90-дневно изследване. Изследването на параметрите за оценка на състоянието на сперматозоидите трябва да бъде извършено на всички мъжки животни от кохорта 1А.
57. При прекратяването теглата на тестисите и епидидимите се записват за всички мъжки животни от Р и F<sub>1</sub> (кохорта 1А). Най-малко един тестис и един епидидим се запазват за хистопатологично изследване. Останалият епидидим се използва за изброяване на резервите от сперматозоиди от опашката на епидидима (16)(17). В допълнение, сперматозоидите от опашката на епидидима (или семепровода) се събират чрез използването на методи, свеждащи до минимум уврежданията с оглед оценка на подвижността и морфологията на сперматозоидите (18).
58. Подвижността на сперматозоидите може да бъде оценена непосредствено след умъртвяването или записана за по-късен анализ. Процентът на прогресивно подвижните сперматозоиди може да се определи субективно или обективно чрез компютърен анализ на движението (19)(20)(21)(22)(23)(24). За оценка на морфологията на сперматозоидите, проба от сперматозоиди от епидидима (или семепровода) се изследват като фиксирани или влажни препарати (25) и най-малко 200 сперматозоиди от проба се класифицират или като нормални (както главата, така и средната част/опашката изглеждат нормални), или като отклоняващи се от нормата. Примери за морфологични отклонения са: слепване, наличие на глави, отделени от тялото и опашката, промени във формата на главите и/или опашките (26). Промени във формата на главите или големи глави на сперматозоиди може да показват дефекти в узряването на сперматозоидите.
59. Ако пробите от сперматозоиди са замразени, натривките са фиксирани и изображенията за анализ на движението на сперматозоидите са записани по време на аутопсията (27), последващият анализ може да бъде ограничен до мъжките от контролните групи и групите на висока доза. Въпреки това, ако се наблюдават ефекти, свързани с третирането, следва също да бъдат оценени и групите на по-ниска доза.

#### Макроскопска аутопсия

60. В момента на умъртвяването или при настъпването на преждевременна смърт по време на изпитването следва да се извърши аутопсия и макроскопски оглед на всички животни от Р и F<sub>1</sub>, за да се установи наличието на структурни аномалии или патологични промени. Особено внимание при огледа трябва да се обърне на органите на половата система. Новородените, които са били в терминално състояние и са умъртвени по хуманен начин, или са умрели, трябва бъдат записани и, ако трупите им не са мацерирани, да се изследват за възможни дефекти и/или причини за смъртта и трупите им да бъдат запазени.
61. За полово зрели женски от Р и F<sub>1</sub> се изследва вагинална натривка в деня на аутопсия, за да се определи етапът на естралния цикъл и да се даде възможност за корелация с хистопатологичното изследване на репродуктивните органи. Матките на всички женски животни от Р (и женски от F<sub>1</sub>, ако е приложимо) се изследват за наличие и брой на местата на имплантация, по начин, който не нарушава хистопатологичното изследване.

#### Тегло на органи и съхранение на тъкани — полово зрели животни от Р и F<sub>1</sub>

62. Към момента на прекратяване телесните тегла и теглата в мокро състояние на органите, изброени по-долу, от всички животни от поколение Р и всички полово зрели животни от F<sub>1</sub> от всички относими кохорти (както е посочено по-долу), се определят колкото е възможно по-бързо след дисекцията, за да се избегне изсъхването им. Тези органи следва впоследствие да бъдат запазени при подходящи условия. Освен ако не е указано друго, всеки от чифтните органи може да се измери самостоятелно или в комбинация, в съответствие с обичайните практики на изпитващата лаборатория.

— Матка (с яйцепровод и шийка на матката), яйчници

— Тестиси, епидидими (общо и опашката за проби, използвани за преброяване на сперматозоиди)

— Простата (комбинирано дорзолатерален и вентрален дял). Трябва да се внимава при почистване на простатата и семенните мехурчета с коагулиращите жлези, за да се избегне пункция на изпълнените с течност семенни мехурчета. В случай на свързан с третирането ефект върху общото тегло на простатата, на дорзолатералния и вентралния дял следва внимателно да се извърши дисекция след фиксиране, и да се претеглят поотделно.

- Семенни мехурчета с коагулиращите жлези и течното им съдържимо (измерват се заедно)
  - Мозък, черен дроб, бъбреци, сърце, далак, тимус, хипофиза, щитовидна жлеза (след фиксиране), надбъбречни жлези и познати прицелни органи или тъкани.
63. В допълнение към органите, изброени по-горе, при подходящи условия следва да бъдат запазени проби от периферен нерв, мускул, гръбначен мозък, око плюс очен нерв, стомашно-чревен тракт, пикочен мехур, бял дроб, трахея (с прикрепени щитовидна жлеза и околощитовидна жлеза), костен мозък, семепровод (мъжки животни), млечна жлеза (мъжки и женски животни) и влагалище.
64. Всички органи на животните от кохорта 1А се претеглят и съхраняват за хистопатологично изследване.
65. За изследването на пренатално и постнатално индуцираните имунотоксични ефекти 10 мъжки и 10 женски животни от кохорта 1А от всяка третирана група (1 мъжко или 1 женско от котило; всички котила се представят от най-малко по 1 новородено; избрани на случаен принцип) се подлагат на следното при прекратяване:
- претегляне на лимфните възли, свързани с пътя на експозиция и отдалечени от него (в допълнение към теглото на надбъбречните жлези, тимуса и далака, вече измерено за всички животни от кохорта 1А)
  - анализ на далачната субпопулация лимфоцити (CD4+ и CD8+ Т-лимфоцити, В-лимфоцити, както и клетки естествени убийци) с използване на едната половина от далака, като другата половина на далака се съхранява за хистопатологично изследване.
- Анализът на далачните субпопулации лимфоцити в неимунизирани животни (кохорта 1А) определя дали експозицията е свързана с изместване на разпределението при имунологичното стационарно състояние на „помощниците“ (CD 4 +) или цитотоксичните (CD 8 +) Т-лимфоцити или клетките естествени убийци (NK-клетки) (бързи отговори на неопластични клетки и патогени).
66. Следните органи на животните от кохорта 1Б се претеглят и съответстващите тъкани се обработват във вид на блокчета:
- Влагалище (не претеглено)
  - Матка, включително шийката
  - Яйчници
  - Тестиси (най-малко един)
  - Епидидими
  - Семенни мехурчета с коагулиращите жлези
  - Простата
  - Хипофиза
  - Идентифицирани прицелни органи

При кохорта 1Б следва да се извърши хистопатология, ако резултатите от кохорта 1А са неясни, или в случаи на предполагаеми токсични за репродукцията химикали или нарушители на функциите на ендокринната система.

67. Кохорти 2А и 2Б: Изпитване за невротоксичност за развиващия се организъм (ПНД 21 или ПНД 22 и полово зряло потомство). Животните от кохорта 2А се умъртвяват след поведенческите изпитвания, записва се теглото на мозъка им и им се извършва пълна неврохистопатология за целите на оценката на невротоксичността. Животните от кохорта 2Б се умъртвяват през ПНД 21 или ПНД 22, записва се теглото на мозъка им и се извършва микроскопски оглед на мозъка за целите на оценката на невротоксичността. Фиксирането чрез перфузия е задължително за животните от кохорта 2А и по избор за животните от кохорта 2Б, съгласно метод за изпитване Б.53 (35).

#### **Тегло на органи и съхранение на тъкани — отбити животни от F<sub>1</sub>**

68. Новородените, които не са разпределени по кохорти, включително малорасли животни, се умъртвяват след отбиването на ПНД 22, освен ако резултатите показват нужда от допълнителни интравитални проучвания. Умъртвените новородени животни се подлагат на макроскопска аутопсия, включително оценка на репродуктивните органи, както е описано в параграфи 62 и 63. Следва да се претеглят и съхраняват при подходящи условия мозък, далак и тимус от до 10 новородени животни от пол за група от толкова на брой котила, колкото е възможно. В допълнение, тъкани от млечните жлези на тези мъжки и женски новородени животни могат да бъдат съхранени за по-нататъшен микроскопски анализ <sup>(1)</sup> (вж. Ръководство № 151 на ОИСП (40)). Макроскопските аномалии и прицелните тъкани следва да бъдат запазени за възможно хистологично изследване.

<sup>(1)</sup> Изследванията показват, че млечната жлеза, особено при развитието на млечните жлези в ранния период, е чувствителна крайна точка за действието на естрогена. Препоръчва се крайните точки, включващи млечните жлези на новородени от двата пола, да бъдат включени в настоящия метод за изпитване при валидирането му.

**Хистопатология — животни от поколение Р**

69. Пълно хистопатологично изследване на органите, посочени в параграфи 62 и 63, се извършва за всички животни от контролната група и групата на висока доза от поколение Р. Органи, показващи свързани с третирането изменения, следва също да бъдат изследвани при всички животни в групите на по-ниска доза, за да се подпомогне определянето на NOAEL. Освен това на хистопатологично изследване трябва да бъдат подложени репродуктивните органи на всички животни, при които има съмнение за понижен фертилитет, например тези, при които чифтосването, оплождането или зачеването са били неуспешни, тези, които не са родили здраво потомство, както и тези, при които е засегнат естралният цикъл или се установяват промени в броя, подвижността или морфологията на сперматозоидите.

**Хистопатология — животни от поколение F<sub>1</sub>***Животни от кохорта 1*

70. Пълно хистопатологично изследване на органите, посочени в параграфи 62 и 63, се извършва за всички полово зрели животни от кохорта 1А от контролната група и групата на висока доза. Всички котила следва да се представят от най-малко по 1 новородено от пол. Органи и тъкани, показващи свързани с третирането изменения, и всички макроскопски увреждания следва също да бъдат изследвани при всички животни в групите на по-ниска доза, за да се подпомогне определянето на NOAEL. За оценката на пренатално и постнатално индуцираните ефекти върху лимфоидните органи също така следва да се оцени и хистопатологията на събраните лимфни възли и костен мозък от 10 мъжки и 10 женски животни от кохорта 1А, освен хистопатологичната оценка на тимуса, далака, и надбъбречните жлези, която вече е извършена за всички животни от кохорта 1А.
71. Тъкани от репродуктивната и ендокринната система от всички животни от кохорта 1Б, обработени във вид на блокчета, както е описано в параграф 66, трябва да се изследват за хистопатология в случаи на предполагаеми токсични за репродукцията химикали или нарушители на функциите на ендокринната система. На кохорта 1Б също трябва да бъде направено хистологично изследване, ако резултатите от кохорта 1А са неясни.
72. Яйчниците на полово зрелите женски животни трябва да съдържат примордиални и зреещи фоликули, както и жълти тела; следователно хистопатологичното изследване следва да е насочено към количествена оценка на примордиални и малки зреещи фоликули, както и жълти тела, в женски животни от F<sub>1</sub>; броят на животните, изборът на срезове от яйчниците и броят на срезовете, включени в изследваната извадка, трябва да бъдат обосновани от статистическа гледна точка във връзка с използваната процедура за количествена оценка. Изброяването на фоликулите може първо да се извърши при животните от контролните групи и групите на висока доза и, в случай на неблагоприятен ефект при последните, следва да бъдат изследвани групите на по-ниски дози. Изследването следва да включва определяне на броя на примордиалните фоликули, които могат да се изброят заедно с малките зреещи фоликули, за сравнение с третираните и контролните яйчници (вж. Ръководство № 151 на ОИСП (40)). Оценката на жълтите тела следва да се извършва паралелно с изпитването на естралната цикличност, така че етапът на цикъла да може да бъде взет предвид при оценката. Яйцепроводът, матката и влагалището се изследват за подходящо типично за органа развитие.
73. Подробни изследвания на тестикуларната хистопатология се извършват на мъжките от поколение F<sub>1</sub>, за да се определят свързани с третирането ефекти върху диференцирането и развитието на тестисите и върху сперматогенезата (38). Когато е възможно, трябва да бъдат изследвани срезове от мрежата на тестиса. Главата, тялото и опашката на епидидима и семепровода се изследват за подходящо типично за органа развитие, както и по отношение на параметрите, изисквани за мъжките от Р.

*Животни от кохорта 2*

74. Неврохистопатологията се извършва за всички животни от кохорта 2А от групата на висока доза и контролната група по пол след завършване на невроповеденческите изпитвания (след ПНД 75, но не след ПНД 90). Хистопатологията на мозъка се извършва за всички животни от кохорта 2Б от групата на висока доза и контролната група по пол през ПНД 21 или ПНД 22. Органи или тъкани, показващи свързани с третирането изменения, следва също да бъдат изследвани при животните в групите на по-ниска доза, за да се подпомогне определянето на NOAEL. За животни от кохорти 2А и 2Б се изследват множество срезове от мозъка, за да се даде възможност за изследване на обонятелните луковичи, кората на големия мозък, хипокамп, базалните ганглии, таламуса, хипоталамуса, средния мозък (тектум, тегментум и малкомозъчни крачета), мозъчен ствол и малък мозък. Само за кохорта 2А се изследват очите (ретината и очен нерв) и проби от периферен нерв, мускул и гръбначен мозък. Всички неврохистологични процедури трябва да съответстват на метод за изпитване В.53 (35).
75. Следва да се извършат морфометрични (количествени) оценки на представителни зони на мозъка (хомоложни срезове, внимателно подбрани въз основа на надеждни микроскопски ориентири) и същите могат да включват линейни измервания или измерване на площ на специфични области от мозъка. Следва да бъдат взети най-малко три последователни среза при всеки ориентир (равнище), с цел да се избере най-хомоложният и представителен срез за оценяваната специфична област от мозъка. Невропатологът следва да направи подходяща професионална

преценка относно това дали приготвените за измерване срезове са хомоложни с други в набора от проби и оттам дали са подходящи за включване, тъй като в частност линейните измервания могат да се променят в рамките на относително кратко разстояние (28). Нехомоложни срезове не следва да се използват. Въпреки че целта е да се вземат проби от всички животни, предназначени за тази цел (10 от пол от ниво на доза), по-малък брой все още може да е подходящ. Пробите от по-малко от 6 животни от всеки пол и ниво на доза обаче по принцип не се считат за достатъчни за целите на настоящия метод за изпитване. Може да се използва стереология за установяване на свързани с третирането ефекти върху параметри като обем или брой на клетките за специфични невроанатомични области. Всички аспекти от подготовката на проби от тъкани, от фиксирането на тъкани през дисекцията на проби от тъкани, обработката на тъкани и оцветяването на предметните стъкла, трябва да са по план, балансиран така, че всяка партида да съдържа представителни извадки от всяка група с определена доза. Когато трябва да се използва морфометричен или стереологичен анализ, мозъчна тъкан следва да бъде включена в подходяща среда при всички нива на доза и по едно и също време, за да бъдат избегнати артефакти на свиване, свързани с продължително съхранение във фиксатор.

#### ДОКЛАДВАНЕ

##### Данни

76. Данните се докладват индивидуално и обобщени в табличен вид. Когато това е приложимо, за всяка изпитвана група и всяко поколение следва да бъдат докладвани: броят на животните в началото на изследването, броят на животните, които са открити мъртви по време на изследването или са били умъртвени по хуманни причини, времето на смъртта или умъртвяването по хуманни причини, броят на фертилните животни, броят на бременните женски животни, броят на женските животни, даващи котило и броят на животните с проявени признаци на токсичност. Следва също да бъде докладвано описание на токсичността, включително времето на настъпване, продължителността и силата.
77. Резултатите, изразени количествено, трябва да се оценят чрез подходящ и общоприет статистически метод. Статистическите методи следва да се подбират като част от плана на изследването и следва по подходящ начин да включват данни, които не са с нормално разпределение (например данни от броене), цензурирани данни (например ограничено време за наблюдение), измервания, които не са независими (например ефекти върху котилата и повторения се мерки), както и нееднакви дисперсии. Обобщените смесени линейни модели и моделите доза-отговор обхващат широк клас от аналитични инструменти, които могат да бъдат подходящи за обработка на данните, получени съгласно настоящия метод за изпитване. Докладът трябва да включва достатъчно информация за използваните метод за анализ и компютърна програма, така че да може да бъде извършена оценка/повторна оценка от независим проверяващ/статистик.

##### Оценка на резултатите

78. Констатациите следва да се оценяват въз основа на наблюдаваните ефекти, включително данните от макроскопската аутопсия и микроскопските находки. Оценка включва връзката или липсата на връзка между дозата и наличието, честотата и силата на отклоненията от нормата, включително макроскопските увреждания. Следва да бъдат оценени и прицелните органи, плодовитостта, клиничните аномалии, параметрите на репродукцията и котилото, измененията в телесното тегло, смъртността и всякакви други ефекти, свързани с токсичността и развиващия се организъм. Специално внимание следва да се обърне на специфичните за пола изменения. Физичните и химичните свойства на изпитвания химикал и, когато са налични, данните от ТК, включително преминаване през плацентата и екскреция чрез млякото, трябва да се вземат под внимание при оценката на резултатите от изпитването.

##### Доклад от изпитването

79. Докладът от изпитването следва да включва следната информация, получена от животните от поколения P, F<sub>1</sub> и F<sub>2</sub> в рамките на настоящото изследване (където е уместно):

##### Изпитван химикал:

- Всяка налична информация за химичните, токсикокинетичните и токсикодинамичните свойства на изпитвания химикал;
- Данни за идентифициране;
- Чистота;

##### Носител (когато се използва такъв):

- Обосновка за избора на носител, когато е различен от вода;

*Изпитвани животни:*

- Използван вид/порода;
- Брой, възраст и пол на животните;
- Източник, условия на отглеждане, хранителен режим, материали за гнездене и т.н.;
- Индивидуално тегло на животните в началото на изпитването;
- Данни за вагинални натривки за женски животни от Р преди започване на третирането (ако са събрани данни към посочения момент);
- Записи за чифтосване за поколение Р, указващи мъжкия и женския партньор от чифтосването и успешна копулация;
- Записи за котилото, от което произхожда животното за полово зрелите животни от поколение F<sub>1</sub>;

*Условия на изпитване:*

- Обосновка за избора на нивото на доза;
- Подробна информация за състава на изпитвания химикал/изготвянето на хранителния режим, достигнати концентрации;
- Стабилност и хомогенност на сместа в носителя (напр. хранителен режим, питейна вода), в кръвта и/или в млякото при условията на използване и на съхранение между използванията;
- Подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- Превръщане от концентрация на изпитвания химикал в храна/питейна вода (ppm) в действителна доза (mg на kg телесно тегло дневно), ако е приложимо;
- Подробна информация за качеството на храната и водата (включително състав на хранителния режим, ако е на разположение);
- Подробно описание на процедурата за избор на случаен принцип на новородени животни за бракуване, както и за разпределяне на новородени животни по групи за изпитване;
- Условия на околната среда;
- Списък на изследователския персонал, включително и професионално обучение;

*Резултати (обобщение и индивидуални данни по пол и доза):*

- Консумацията на храна, консумацията на вода, ако има данни, хранителна ефективност (наддаване на телесно тегло на грам консумирана храна, с изключение на периода на съжителството и по време на кърмене), както и консумация на изпитван химикал (за прилагане чрез хранителен режим/питейна вода) за животни от Р и F<sub>1</sub>;
- Данни за абсорбция, ако са налични;
- Данни за телесното тегло за животните от поколение Р;
- Данни за телесното тегло на избраните животни от F<sub>1</sub>;
- Време на настъпване на смъртта по време на изследването, или дали животните са преживели до прекратяването;
- Природа, сила и продължителност на клиничните наблюдения (независимо обратими или необратими);
- Данни от хематология, анализ на урина и клинична химия, включително TSH и T4;
- Фенотипен анализ на далачни клетки (Т-, В-, NK-клетки);
- Клетъчност на костен мозък;
- Данни за токсичен отговор;
- Брой на женските животни от поколение Р и F<sub>1</sub> с нормален или отклоняващ се от нормата естрален цикъл и продължителност на цикъла;
- Време до копулация (интервал преди копулацията, брой дни от чифтосването до копулацията);
- Токсични или други ефекти върху репродукцията, в това число брой и процентни дялове на животните, които са преминали през копулация, бременност, раждане и кърмене, на мъжките животни, предизвикали бременност, на женските животни с признаци на трудно/продължително раждане;
- Продължителност на бременността и, при наличност, раждане;
- Брой на имплантациите, големината на котилото и процент на мъжки новородени;

- Брой и процент на постимплантационната загуба, живородени и мъртвородени;
- Данни за тегло на котилото и на новородените (мъжки, женски и комбинирано), брой на малораслите животни, ако е определен;
- Брой новородени с видими макроскопски аномалии;
- Токсични или други ефекти върху поколението, постнатален растеж, жизнеспособност и т.н.;
- Данни за физическите ориентирани на потомството и други данни за постнаталното развитие на организма;
- Данни за полово съзряване на животните от  $F_1$ ;
- Данни за функционалните наблюдения при новородените и при полово зрелите животни, когато това е приложимо;
- Телесно тегло в деня на умъртвяването и данни за абсолютно и за относително тегло на органи за полово зрелите животни от Р и  $F_1$ ;
- Находки при аутопсията;
- Подробно описание на всички хистопатологични находки;
- Общ брой на сперматозоидите в опашката на епидидима, процент на прогресивно подвижните сперматозоиди, процент на сперматозоидите с нормална морфология и процент на сперматозоидите с всеки вид аномалия, който е установен за мъжки животни от Р и  $F_1$ ;
- Брой и етапи на узряване на фоликули, съдържащи се в яйчниците на женски животни от Р и  $F_1$ , когато е приложимо;
- Изброяване на жълтите тела в яйчниците на женски животни от  $F_1$ ;
- Статистическа обработка на резултатите, ако е подходящо;

#### Параметри на кохорта 2:

- Подробно описание на процедурите, които се използват за стандартизиране на наблюденията, и на процедурите, както и на работните определения при използване на точкови системи за наблюденията;
- Списък на всички използвани процедури на изпитване, както и обосновка за тяхното използване;
- Подробности за използваните поведенчески/функционални, невропатологични и морфометрични процедури, включително информация и подробности относно автоматизирани устройства;
- Процедури за калибриране и гарантиране на равностойността на устройствата и на балансирането на третираните групи в процедурите за изпитване;
- Кратка обосновка, която обяснява всички решения, свързани с професионална преценка;
- Подробности за всички поведенчески/функционални, невропатологични и морфометрични констатации по пол и група на определена доза, включващи както увеличението, така и намаленията в сравнение с контролите;
- Тегло на мозъка;
- Всякакви диагнози, получени от неврологични признаци и увреждания, включително появили се по естествен път заболявания или състояния;
- Изображения на репрезентативни находки;
- Изображения с незначително увеличение за установяване на хомоложността на срезове, използвани за морфометрията;
- Статистическа обработка на резултатите, включително статистически модели, използвани за анализ на данните и резултатите, независимо от това дали са значими, или не;
- Връзка на всякакви други токсични ефекти със заключението за невротоксичния потенциал на изпитвания химикал, по пол и група на определена доза;
- Въздействие на всякаква токсикокинетична информация върху заключенията;
- Данни в подкрепа на надеждността и чувствителността на метода за изпитване (т.е. положителни и контролни данни за минали периоди);
- Зависимости (ако има такива) между невропатологични и функционални ефекти;
- NOAEL или еталонна доза за майки и потомство, по пол и група на определена доза;
- Обсъждане на общото тълкуване на данните въз основа на резултатите, включително заключение дали химикалът е причинил невротоксичност за развиващия се организъм, и NOAEL.

*Параметри на кохорта 3:*

- Титри на IgM-антитела в серума (сенситизация към SRBC или KLH) или брой на IgM PFC в далака (сенситизация към SRBC);
- Прилагането на метода TDAR следва да бъде потвърдено като част от процеса на оптимизация от лаборатория, извършваща изследването за първи път, и периодично (например ежегодно) от всички лаборатории;
- Обсъждане на общото тълкуване на данните въз основа на резултатите, включително заключение дали химикалът е причинил имунотоксичност за развиващия се организъм, и NOAEL;

*Обсъждане на резултатите**Заключения, включително стойности на NOAEL, за ефектите върху родителите и потомството*

Цялата информация, която не е получена по време на изследването, но е полезна при тълкуването на резултатите (напр. сходства на ефектите на всички известни невротоксични химикали), следва също да бъде предоставена.

**Тълкуване на резултатите**

80. Чрез разширеното изследване за токсичност за репродукцията в едно поколение, според необходимостта, се осигурява информация за ефектите от повтарящата се експозиция на даден химикал през всички фази на репродуктивния цикъл. По-специално изследването дава информация за репродуктивната система, както и за развитието, растежа, преживяемостта и функционалните крайни точки на потомството до ПНД 90.
81. При тълкуването на резултатите от изследването следва да се вземе предвид цялата налична информация за химикала, включително физични, химични, токсикокинетични и токсикодинамични свойства, наличната относима информация за структурни аналози, и резултатите от предходни изследвания за токсичност с изпитвания химикал (напр. остра токсичност, токсичност след повтарящо се прилагане, механистични изследвания и изследвания за оценка на наличието на съществени качествени и количествени различия в метаболитните свойства *in vivo/in vitro* при различните видове). Резултатите от макроскопската аутопсия и телесното тегло трябва да се оценяват в контекста на наблюденията, проведени по време на други изследвания с повтаряща се доза, когато това е възможно. Намаленията в растежа на потомството биха могли да се разглеждат във връзка с влияние на изпитвания химикал върху състава на млякото (29).

*Кохорта 2 (невротоксичност за развиващия се организъм)*

82. Резултатите от невроповеденческите и невропатологическите изследвания следва да се тълкуват в контекста на всички находки, с използване на основан на тежестта на доказателствата подход с експертна преценка. Моделите на поведенчески или морфологични констатации, ако има такива, както и доказателства за зависимостта доза-отговор следва да бъдат обсъдени. В това охарактеризиране трябва да бъде включена оценката на невротоксичността за развиващия се организъм, включително епидемиологични изследвания върху човека или докладвани случаи и експериментални изследвания върху животни (напр. токсикокинетични данни, информация за зависимост структура-активност, данни от други изследвания за токсичност). Оценката на данните следва да включва обсъждане както на биологичната, така и на статистическата значимост. Оценката следва да включва връзката (ако има такава) между наблюдаваните невропатологични и поведенчески изменения. Насоки относно тълкуването на резултатите за невротоксичност за развиващия се организъм се съдържат в метод за изпитване Б.53 (35) и в Tyl et al., 2008 (31).

*Кохорта 3 (имуноотоксичност за развиващия се организъм)*

83. Потискането или подобряването на имунната функция, както е оценено чрез TDAR (зависим от Т-клетки отговор чрез образуване на антитела), следва да се оценяват в контекста на всички извършени наблюдения. Значението на резултатите от TDAR може да бъде подкрепено от други ефекти върху имунологично-свързаните показатели (напр. клетъчност на костен мозък, тегло и хистопатология на лимфоидни тъкани, разпределение на подгрупите на лимфоцитите). Ефектите, установени чрез TDAR, могат да бъдат по-малко съдържателни при друга токсичност, наблюдавана при по-ниски концентрации на експозиция.
84. Ръководство № 43 на ОИСП следва да бъде консултирано за помощ при тълкуването на резултати за репродуктивната токсичност и невротоксичност (26).

**ЛИТЕРАТУРА**

- (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, № 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, № 422, OECD, Paris.
  - (33) Глава Б.43 от настоящото приложение, Невротоксикологично изследване при гризачи
  - (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, № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
  - (35) Глава Б.53 от настоящото приложение, Изследване за невротоксичност за развиващия се организъм
  - (36) Глава Б.54 от настоящото приложение, Утеротрофично биологично изследване при гризачи: Краткосрочно скринингово изследване за естрогенни свойства
  - (37) Глава Б.55 от настоящото приложение, Биологично изследване на Hershberger при плъхове: Краткосрочно скринингово изследване за (анти)андрогенни свойства
  - (38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, № 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, № 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, № 151, OECD, Paris.
-

## Допълнение 1

**Измервания и наблюдения, включени в батерията от функционални изпитвания (Кохорта 2А)**

| В клетка и на открито               | Свързани с манипулиране                                   | Физиологични         |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|
| Стойка                              | Трудност на изваждане                                     | Температура          |
| Неволни клонични и тонични движения | Трудност на боравене                                      | Телесно тегло        |
| Затваряне на клепачите              | Мускулен тонус                                            | Реакция на зениците  |
| Пилоерекция                         | Отговор при доближаване                                   | Големина на зениците |
| Слюноотделяне                       | Отговор при допир                                         |                      |
| Сълзотечение                        | Слухов отговор                                            |                      |
| Издаване на звуци                   | Отговор при ошипване на опашката                          |                      |
| Изправяне на задни крайници         | Рефлекс за връщане в първоначално положение след обръщане |                      |
| Аномалии в походката                | Разстояние между лапите след пускане от 30 cm на земята   |                      |
| Събуждане                           | Сила на захват на предните крайници                       |                      |
| Стереотипно поведение               | Сила на захват на задните крайници                        |                      |
| Необичайно поведение                |                                                           |                      |
| Петна                               |                                                           |                      |
| Аномалии в дишането                 |                                                           |                      |

---

Допълнение 2

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Химикал:** Вещество или смес.

**Изпитван химикал:** Всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

---

## Б.57. ИЗСЛЕДВАНЕ НА СТЕРОИДОГЕНЕЗАТА В H295R КЛЕТКИ

## УВОД

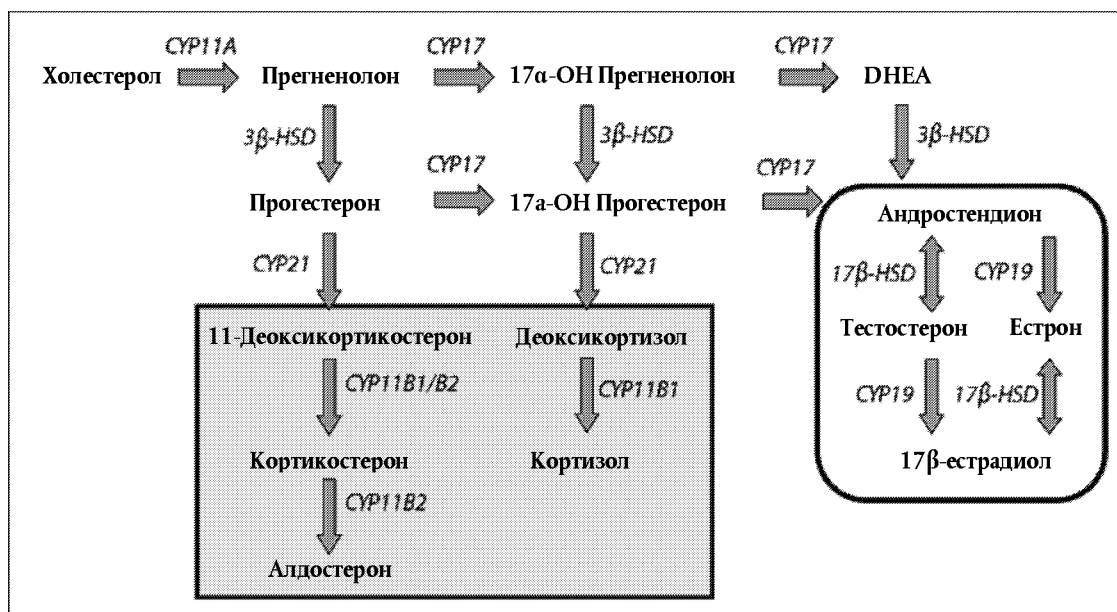
1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 456 (2011). През 1998 г. ОИСП стартира с висок приоритет дейност по преразглеждане на съществуващите и по разработване на нови указания за скрининг и изпитвания за потенциално нарушаващи функциите на ендокринната система химикали (1). Концептуалната рамка на ОИСП от 2002 г. за изпитване и оценка на химикали, нарушаващи функциите на ендокринната система, се състои от пет равнища, всяко от които съответства на различно равнище на биологична сложност (1). Изследването *in vitro* на стероидогенезата в H295R клетки (H295R), описано в настоящия метод за изпитване, при което се използва клетъчна линия от карцином на кората на надбъбреците при човека (NCI-H295R клетки), представлява равнище 2 „изследване *in vitro*, предоставящо механистични данни“, които да се използват за целите на скрининга и приоритизирането. Разработването и стандартизирането на изследването като скринингово за ефектите от химикали върху стероидогенезата, по-специално върху производството на 17 $\beta$ -естрадиол (E2) и тестостерон (Т), беше извършено като процес, включващ няколко стъпки. Изследването в H295R клетки е оптимизирано и валидирано (2)(3)(4)(5).
2. Целта на изследването на стероидогенезата в H295R клетки е да се открият химикали, които въздействат върху производството на E2 и Т. Изследването в H295R клетки цели да се идентифицират ксенобиотици, имащи за свое прицелно място или места ендогенните компоненти, които включват вътреклетъчния биохимичен път, започващ с последователността от реакции от холестерола до производството на E2 и/или Т. Изследването в H295R клетки не е предназначено за определяне на химикали, които засягат стероидогенезата поради въздействие върху хипоталамус-хипофиза-гонадната ос (ос ХХГ). Целта на изследването е да се предостави отговор „ДА/НЕ“ по отношение на потенциала на даден химикал да предизвиква или потиска производството на Т и E2; В някои случаи обаче могат да бъдат получени количествени резултати (вж. параграфи 53 и 54). Резултатите от изследването се изразяват като относителни промени в производството на хормони в сравнение с контролните проби на разтворител (КПР). Изследването няма за цел да даде специфична механистична информация относно взаимодействието на изпитвания химикал с ендокринната система. Научните изследвания са проведени с използване на клетъчна линия, за да се идентифицират ефектите върху специфични ензими и хормони предшественици като прогестерон (2).
3. Определенията и съкращенията, използвани за този метод за изпитване, са описани в Допълнението. Подробен протокол, включително инструкции за начина, по който трябва да се приготвят разтвори и клетъчни култури, и да се извършват различни аспекти на изпитването, е на разположение като допълнение I-III към документ на ОИСП „Многолабораторно валидиране на изследването на стероидогенезата в H295R клетки за идентифициране на модулатори на производството на тестостерон и естрадиол“ (4).

## ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

4. Пет различни ензима, катализиращи шест различни реакции, са свързани с биосинтезата на полови стероидни хормони. Превръщането по ензимен път на холестерола в прегненолон чрез ензим (CYP11A), прекъсващ страничната верига на холестерола, от цитохром P450 (CYP), представлява първата крачка в последователност от биохимични реакции, които завършват със синтеза на стероидни крайни продукти. В зависимост от поредността на следващите две реакции, стероидогенният път се разделя на два пътя,  $\Delta^5$ -хидроксистероиден и  $\Delta^4$ -кетостероиден, които се сливат при производството на андростендион (фигура 1).
5. Андростендион се преобразува в тестостерон (Т) от 17 $\beta$ -хидроксистероиддехидрогеназа (17 $\beta$ -HSD). Тестостеронът е едновременно предшественик и краен продукт. В мъжкия организъм Т може да се преобразува в дихидротестостерон (ДХТ) чрез 5 $\alpha$ -редуктаза, която се намира в клетъчните мембрани, ядрената обвивка и ендоплазматичния ретикулум на прицелните за андрогенната активност тъкани, като простатата и семенните мехурчета. ДХТ е значително по-мошен андроген от Т и също така се счита за краен продукт. Изследването на стероидогенезата в H295R клетки не измерва ДХТ (вж. параграф 10).
6. Ензимът в стероидогенния път, който превръща андрогенни химикали в естрогенни химикали, е ароматаза (CYP19). CYP19 превръща Т в 17 $\beta$ -естрадиол (E2) и андростендиона в естрон. E2 и Т се считат за крайни продукти на стероидогенния път.
7. Спецификата на лиазната активност на CYP17 е различна при различните видове по отношение на междинните субстрати. При човека ензимът благоприятства субстрати на  $\Delta^5$ -хидроксистероидния път (прегненолон), докато при плъховете се благоприятстват субстрати от  $\Delta^4$ -кетостероидния път (прогестерон) (19). Тези разлики в лиазната активност на CYP17 могат да обяснят някои различия при отделните видове в отговора на химикали, които променят стероидогенезата *in vivo* (6). H295R клетките са показали, че съответстват в най-голяма степен на модела на генната експресия чрез ензими и производството на стероиди в надбъбречната жлеза на полово зрели хора (20), но е известно, че при тях експресията е чрез ензими както за  $\Delta^4$ -хидроксистероидния, така и за  $\Delta^5$ -кетостероидния път за синтеза на андрогени (7)(11)(13)(15).

Фигура 1

## Стероидогенен път в H295R клетки.



## Забележка:

Ензимите са в курсив, хормоните са с удебелен шрифт, а стрелките указват посоката на синтеза. Сивият фон показва кортикостероидни пътища/продукти. Пътищата/продуктите, свързани с половите стероидни хормони, са оградени в кръг. CYP = цитохром P450; HSD = хидроксистероиддехидрогеназа; DHEA = дехидроепиандростерон.

8. Моделът *in vitro* с клетъчна линия (H295R клетки) от карцином на кората на надбъбреците при човека е полезен за изследване на ефектите върху синтеза на стероидни хормони (2)(7)(8)(9)(10). Клетъчната линия H295R експресира гени, кодиращи всички посочени по-горе ключови ензими за стероидогенезата (11)(15) (Фигура 1). Това е уникално свойство, защото експресията *in vivo* на тези гени е зависима от тъканите и етапа на развитие на организма, като обичайно една отделно взета тъкан или етап на развитие на организма не експресира всички гени, участващи в стероидогенезата (2). H295R клетките притежават физиологични характеристики на зонално недиференцирани фетални клетки от надбъбречната жлеза при човека (11). Клетките представляват система *in vitro*, която е уникална с това, че те могат да произвеждат всички стероидни хормони, установени в кората на надбъбречната жлеза и гонадите при полово зрели хора, с което позволяват изпитване за ефектите както върху кортикостероидната синтеза, така и върху производството на полови стероидни хормони, като например андрогени и естрогени, въпреки че изследването е валидирано само за откриване на Т и Е2. Измененията, записани от системата за изпитване под формата на промяна в производството на Т и Е2, могат да бъдат в резултат от множество различни взаимодействия на изпитваните химикали със стероидогенни функции, които се експресират от H295R клетките. Те включват модулация на експресията, синтеза или функцията на ензими, участващи в производството, преобразуването или елиминирането на стероидни хормони (12)(13)(14). Потискането на производството на хормони може да се дължи на пряко конкурентно свързване с ензим от метаболитния път, на въздействие върху кофактори като НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) и цАМФ (цикличен аденозинмонофосфат), и/или на увеличение на стероидния метаболизъм или потискане на генната експресия по отношение на някои ензими в стероидогенния път. Докато потискането може да бъде функция както на преки, така и на косвени процеси, свързани с производството на хормони, индуцирането обикновено има непряк характер, като например чрез въздействие върху кофактори като НАДФ и цАМФ (както при форсколин), намаляване на стероидния метаболизъм (13), и/или положително регулиране на генната експресия при стероидогенезата.
9. Изследването на стероидогенезата в H295R клетки има няколко предимства:
  - Дава възможност за откриване както на увеличения, така и на намаления в производството както на Т, така и на Е2;
  - Позволява пряка оценка на потенциалното въздействие на химикалите върху клетъчната жизнеспособност/цитотоксичността. Това е важна характеристика, тъй като позволява различаване на ефектите, които се дължат на цитотоксичността, от дължащите се на прякото взаимодействие между химикали и стероидогенни пътища, което не е възможно в системи от тъканни експланати, които се състоят от множество видове клетки с различни степени на чувствителност и функционалност;

- То не изисква използването на животни;
- Клетъчна линия H295R се предлага в търговската мрежа.

10. Основните ограничения на изследването са, както следва:

- Неговият метаболитен капацитет е неизвестен, но вероятно доста ограничен; следователно химикали, които е необходимо да бъдат метаболитно активирани, вероятно ще бъдат пропуснати при това изследване.
- Тъй като произхожда от тъкан на надбъбречната жлеза, H295R притежава ензимите, способни да произвеждат глюкокортикоиди и минералкортикоиди, както и полови хормони; поради това ефектите върху производството на глюкокортикоиди и минералкортикоиди биха могли да окажат въздействие върху равнищата на Т и Е2, наблюдавани при изследването.
- То не измерва ДХТ и поради това от него не се очаква да открива химикали, които потискат 5 $\alpha$ -редуктаза, като в последния случай може да бъде използвано изследване на Hershberger (16).
- Изследването на стероидогенезата в H295R клетки не открива химикали, които пречат на стероидогенезата чрез оказване на въздействие върху хипоталамус-хипофиза-гонадната ос (ос ХХГ), тъй като това може да бъде изследвано само при невредими животни.

ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. Целта на това изследване е откриването на химикали, които въздействат върху производството на Т и Е2. Също така Т е предшественик в пътя, водещ до производството на Е2. Изследването може да открива химикали, които обикновено потискат или индуцират ензимите от стероидогенния път.
12. Изпитването обикновено се провежда при стандартни условия за клетъчни култури в 24-гнездови плаки. Като алтернатива, за изследването могат да бъдат използвани плаки с други размери; Въпреки това, посяването и условията на опита следва да бъдат съответно коригирани, за да се поддържа спазването на критериите за параметрите.
13. След период на аклиматизация от 24 часа в многогнездови плаки, клетките се експонират за 48 часа на седем концентрации от изпитвания химикал в най-малко три повторения. Независимо се провежда изпитване с разтворител и познат инхибитор и индуктор на производството на хормони при определена концентрация, като отрицателни и положителни контроли. В края на периода на експозиция средата се отстранява от всяко гнездо. Жизнеспособността на клетките във всяко гнездо се анализира незабавно след отстраняването на средата. Концентрациите на хормони в средата могат да бъдат измерени с помощта на различни методи, включително предлагани в търговската мрежа комплекти за измерване на хормони и/или инструментални техники, като например течна хроматография/маспектрометрия (LC-MS). Данните са изразени каторатно на изменението по отношение на контролата на разтворител и най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект (LOEC). Ако резултатът от изпитването е отрицателен, най-високата изпитвана концентрация се докладва като концентрация без наблюдавано въздействие (NOEC). Закljučенията относно способността на даден химикал да засегне стероидогенезата следва да се основават на най-малко две независими провеждания на изпитването. Първото независимо провеждане на изпитването може да функционира като независимо провеждане за определяне на обхвата с последващи корекции на концентрациите за независими провеждания 2 и 3, ако е приложимо, ако бъдат срещнати затруднения по отношение на разтворимостта или цитотоксичността, или ако изглежда, че активността на химикала е в края на изпитвания обхват от концентрации.

ПРОЦЕДУРА ОТНОСНО КУЛТУРИТЕ

**Клетъчна линия**

14. NCI-H295R клетките са достъпни в търговската мрежа от American Type Culture Collections (ATCC) след подписване на Споразумение за трансфер на материал (MTA) <sup>(1)</sup>.

**Въведение**

15. Поради промени в капацитета за производство на Е2 с увеличаване на възрастта/броя пасаж (2) клетките следва да бъдат култивирани по специален протокол преди да бъдат използвани, и следва да бъдат отбелязани броят на пасажите от размразяването на клетките, както и номерът на пасаж, при който клетките са били замразени и поставени на съхранение в течен азот. Първото число указва текущия номер на пасаж, а второто число описва номера на пасаж, при който клетките са били замразени и поставени на съхранение. Например клетките, които са били замразени след петия пасаж и размразени, и след това са преминали през три разделяния (4 пасажа, като пряко размразените клетки се броят за пасаж номер 1), след като са били култивирани отново, следва да бъдат обозначени като пасаж 4.5. Пример за схема за номериране е показан в Допълнение I към доклада за валидирането (4).
16. Като основа за средата с добавки и средата за замразяване се използва изходна среда. Средата с добавки е необходим компонент при култивирането на клетки. Средата за замразяване е специално проектирана така, че да позволява замразяване на клетки за продължително съхранение без да се оказва въздействие върху тях. Преди

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

употреба, Nu-Serum (или подобен серум с еднакви свойства, за който е доказано, че дава данни, които отговарят на изискванията за параметрите на изпитването и за контрол на качеството (КК)), който е съставка на средата с добавки, трябва да се анализира за фонові концентрации на Т и Е2. Изготвянето на тези разтвори е описано в Допълнение II към доклада за валидирането (4).

17. След инициране на H295R клетъчна култура от оригинална партида от ATCC, клетките трябва да бъдат отглеждани в продължение на пет пасажа (*т.е.* клетките са разделяни 4 пъти). След това клетките от петия пасаж се замразяват в течен азот за съхранение. Преди замразяване на клетките, с проба от клетки от предходния четвърти пасаж независимо се провежда изпитване в плака за КК (виж параграфи 36 и 37), за да се провери дали основното производство на хормони и отговорът на химикали от положителната контрола съответства на критериите за контрол на качеството на изследването, определени в Таблица 5.
18. H295R клетките трябва да бъдат култивирани, замразени и съхранявани в течен азот, за да се гарантира, че винаги има на разположение клетки от подходящ пасаж/възраст за култивиране и използване. Максималният брой пасажи след започването на култивирането на партида нови <sup>(1)</sup> или замразени <sup>(2)</sup> клетки, които са допустими за употреба в изследването на стероидогенезата в H295R клетки, не трябва да превишава 10. Например, допустими пасажи за култури от клетки от партида, замразена при пасаж 5, биха били пасажи от 4.5 до 10.5. За клетките, чието култивиране е започнало от тези замразени партиди, трябва да бъде следвана процедурата, описана в параграф 19. Тези клетки следва да бъдат култивирани в продължение на най-малко четири (4) допълнителни пасажа (пасаж 4.5) преди да бъдат използвани при изпитването.

#### **Започване на култивирането на клетки от замразените количества**

19. Процедурата за започване на култивирането на клетки от замразените количества следва да бъде използвана, когато нова партида на клетките се изважда от съхранение в течен азот с цел култивиране и изпитване. Подробности за тази процедура са дадени в Допълнение III от доклада за валидирането (4). Клетките се изваждат от съхранението в течен азот, бързо се размразяват и се поставят в среда с добавки в центрофужна епруетка, центрофугират се при стайна температура, ресуспендират се в среда с добавки и се прехвърлят в колба за клетъчни култури. Средата трябва да бъде сменена на следващия ден. H295R клетките се култивират в инкубатор при 37 °C с 5 % CO<sub>2</sub> във въздушна атмосфера и средата се подменява 2–3 пъти седмично. Когато настъпи приблизително 85–90 % сливане на клетките, те следва да бъдат разделени. Разделянето на клетките е необходимо, за да се осигури здравето и растежа на клетките и да се поддържат клетки за извършване на биологични изследвания. Клетките се промиват три пъти с фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS, без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>) и се отделят от колбата за клетъчни култури чрез добавяне на подходящ ензим за отделяне, напр. трипсин, в PBS (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>). Непосредствено след като клетките бъдат отделени от колбата за клетъчни култури, действието на ензима следва да бъде прекратено с прибавяне на среда с добавки при съотношение от 3X от обема, използван за третиране с ензима. Клетките се поставят в центрофужна епруетка, центрофугират се при стайна температура, надутаечната течност се отстранява и клетъчната утайка се ресуспендира в среда с добавки. Подходящият обем клетъчен разтвор се поставя в новата колба за клетъчни култури. Обемът на клетъчния разтвор следва да се приспособи така, че клетките да достигнат сливане в рамките на 5–7 дни. Препоръчителното съотношение на субкултивиране е от 1:3 до 1:4. Плаката следва да бъде внимателно етикеткирана. Клетките са вече готови за използване при изследването и излишните клетки следва да бъдат замразени в течен азот, както е описано в параграф 20.

#### **Замразяване на H295R клетки (подготовка на клетки за съхраняване в течен азот)**

20. За подготовка на H295R клетките за замразяване трябва да бъде следвана описаната по-горе процедура за разделяне на клетките до стъпката по ресуспендиране на клетъчната утайка, образувана на дъното на центрофужната епруетка. На този етап клетъчната утайка се ресуспендира в среда за замразяване. Разтворът се прехвърля в подходящо етикеткирана криоепруетка и се замразява при температура – 80 °C за 24 часа, след което криоепруетката се прехвърля в течен азот за съхранение. Подробности за тази процедура са дадени в допълнение III от доклада за валидирането (4).

#### **Поставяне в плаки и предварителна инкубация на клетки за изпитването**

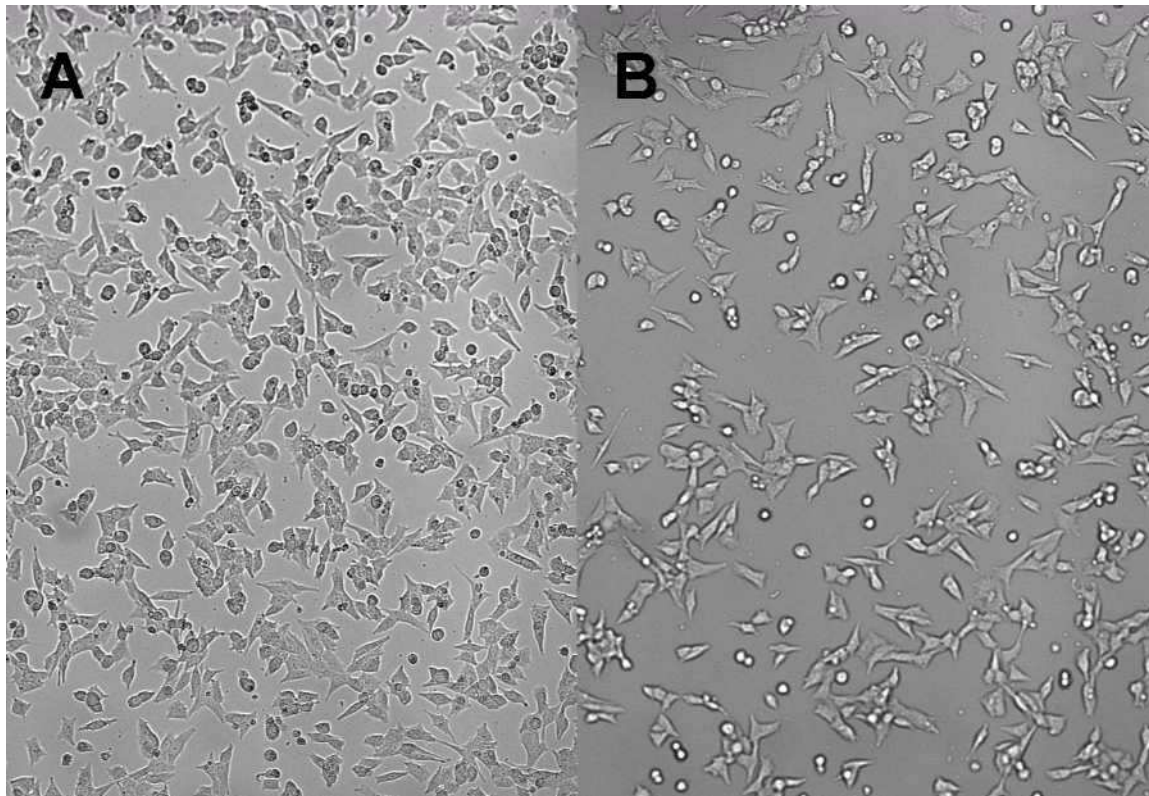
21. Броят на 24-гнездовите плаки, приготвени както е посочено в параграф 19, които ще бъдат необходими, зависи от броя на химикалите, които ще бъдат изпитвани, и от сливането на клетките в блюдата с културите. Като общо правило, една колба за клетъчни култури (75 cm<sup>2</sup>) с 80–90 % достигнали сливане клетки осигурява достатъчно клетки за една до 1,5 (24-гнездова) плака при целева плътност от 200 000 до 300 000 клетки/ml от среда, водеща до сливане приблизително 50–60 % в гнездата след 24 часа (фигура 2). Това обичайно е оптималната плътност на клетките за производство на хормони при изследването. При по-висока плътност моделите на производство на Т, както и на Е2, се променят. Препоръчва се, преди провеждането на изследване за първи път, да бъдат изпитани различни посевни плътности — между 200 000 и 300 000 клетки/ml — и за последващи изпитвания да бъде избрана плътността, водеща до 50–60 % сливане след 24 часа в гнездото.

<sup>(1)</sup> „Нова партида“ се отнася за нова партида от клетки, получени от ATCC.

<sup>(2)</sup> „Замразена партида“ се отнася до клетките, които са били предварително култивирани и впоследствие замразени в лаборатория, различна от ATCC.

Фигура 2

**Микрофотография на H295R клетки при плътност на посяване от 50 % в 24-гнездова плака за клетъчни култури след 24 часа, направена на ръба на гнездото (А) и в центъра му (Б)**



22. Средата се отстранява от колбата за клетъчни култури с пипета и клетките се промиват 3 пъти със стерилен PBS (без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ). Добавя се ензимен разтвор (в PBS) за отделяне на клетките от колбата за клетъчни култури. След даване на достатъчно време за отделяне на клетките действието на ензима следва да бъде прекратено с прибавяне на среда с добавки при съотношение от 3× обема, използван за третиране с ензима. Клетките се поставят в центрофужна епруветка, центрофугират се при стайна температура, надутаечната течност се отстранява и клетъчната утайка се ресуспендира в среда с добавки. Плътността на клетките се изчислява, като се използва например хемцитометър или клетъчен брояч. Разтворът с клетките следва да се разрежи до желаната плътност в гнездата и щателно да се разбърка, за да се осигури хомогенна плътност на клетките. Клетките следва да бъдат поставени в гнездата с 1 ml от разтвор с клетки във всяко гнездо, и плаките и гнездата следва да бъдат етикетирани. Плаките с поставените разтвори с клетки се инкубират при температура 37 °C при 5 %  $\text{CO}_2$  във въздушна атмосферата в продължение на 24 часа, за да се даде възможност на клетките да се прикрепят към гнездата.

#### ИЗИСКВАНИЯ ЗА КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

23. Изключително важно е по време на дозирането в гнездата да бъдат поставени точни обеми от разтвори и проби, тъй като тези обеми определят концентрациите, използвани в изчисленията на резултатите от изследването.
24. Преди инициране на клетъчната култура и всякакво последващо изпитване всяка лаборатория трябва да докаже чувствителността на своята система за измерване на хормони (параграфи 29—31).
25. Ако трябва да се извършват изследвания с измерване на хормони на основата на антитела, химикалите, които ще бъдат изпитвани, следва преди започване на изпитанието да се анализират за техния потенциал да пречат на системата за измерване, използвана за количествено определяне на Т и Е2, както е посочено в параграф 32.

26. Като разтворител за изследването се препоръчва диметилсулфоксид (DMSO). Ако се използва алтернативен разтворител, трябва да се определи следното:
- Разтворимостта на изпитвания химикал, на форсколин и на прохлораз в разтворителя; както и
  - Цитотоксичността като функция от концентрацията на разтворителя.
- Препоръчва се максимално допустимата концентрация на разтворителя да не превишава  $10\times$  разреждане на най-ниската концентрация на разтворителя, при която се появява цитотоксичност.
27. Преди провеждане на изпитването за първи път, лабораторията следва да проведе опит за определяне дали отговаря на условията, доказващ, че е в състояние да поддържа и постигне подходящи условия за клетъчните култури и условия на изпитването, изисквани за изпитване на химикала, както е описано в параграфи 33—35.
28. При започване на изпитване с използване на нова партида, преди да се използва новата партида от клетки, независимо се провежда изпитване в контролна плака, за да се направи оценка на параметрите на клетките, както е описано в параграфи 36 и 37.

#### Параметри на системата за измерване на хормони

*Чувствителност на метода, точност, прецизност и кръстосана реактивност с матричната проба*

29. За анализа на производството на Т и Е2 от H295R клетки всяка лаборатория може да използва система за измерване на хормони по свой избор, при условие че тази система отговаря на критериите за параметрите, включително границата на количествено определяне (LOQ). Номинално те са 100 pg/ml за Т и 10 pg/ml за Е2 и се основават на основните хормонални равнища, наблюдавани при изследванията за валидиране. Въпреки това могат да бъдат подходящи по-високи или по-ниски равнища, в зависимост от базисните хормонални равнища, достигнати в изпитващата лаборатория. Преди иницирането на плаката за КК и независимите провеждания на изпитването, лабораторията следва да докаже, че с изследването за хормони, което ще се използва, концентрациите в средата с добавки могат да бъдат измерени с достатъчна точност и прецизност, за да отговорят на критериите за КК, посочени в таблици 1 и 5, като анализира белязана проба от среда с добавки с вътрешна контрола с хормон като внесена добавка. Пробата със средата с добавки следва да бъде белязана с прибавяне на най-малко три концентрации за всеки хормон (напр. 100, 500, и 2 500 pg/ml от Т; 10, 50 и 250 pg/ml от Е2; или възможно най-ниските концентрации, които се основават на границите на откриване на избраната система за измерване на хормони могат да се използват за най-ниските концентрации на внесена добавка за Т и Е2) и тази среда с добавки следва да бъде анализирана. Измерените концентрации на хормони в неизвлечени проби трябва да бъдат в рамките на 30 % от номиналните концентрации и колебанията при повторните измервания на една и съща проба не трябва да надвишават 25 % (вж. също таблица 8 за допълнителни критерии за КК). Ако тези критерии за КК са изпълнени, приема се, че избраното изследване за измерване на хормони е достатъчно точно и прецизно и при него не се наблюдава кръстосана реактивност с компонентите от средата (матрична проба), в резултат на която би могло да се очаква значително влияние върху резултата от изследването. В този случай не се изисква извличане на проби преди измерването на хормони.
30. В случай че критериите за КК в таблици 1 и 8 не са изпълнени, може да е налице значителен матричен ефект и следва да се извърши опит с извлечена белязана проба от среда. Пример за схема за извличане е описан в допълнение II към доклада за валидирането (4). Измерванията на концентрациите на хормони в извлечените проби трябва да бъдат направени трикратно. <sup>(1)</sup> Ако може да се докаже, че след извличането компонентите на средата не пречат на метода за откриване на хормон, както е определено от критериите за КК, всички по-нататъшни опити следва да се извършват с използване на извлечени проби. Ако критериите за КК не могат да бъдат изпълнени след извличането, използваната система за измерване на хормони не е подходяща за целта на изследването на стероидогенезата в H295R клетки, и следва да бъде използван алтернативен метод за откриване на хормони.

#### Стандартна крива

31. Хормоналните концентрации в контролните проби на разтворител (SC) следва да бъдат в линейната част на стандартната крива. За предпочитане е стойностите на SC да са близо до центъра на линейната част, за да се гарантира, че индуцирането/потискането на синтезата на хормони може да бъде измерено. Разрежданията на средата (или екстрактите) за измерване трябва да бъдат съответно избрани. Линейната зависимост следва да се определи чрез подходящ статистически подход.

#### Изпитване за пречене на химикала

32. Ако трябва да се извършват изследвания с измерване на хормони на основата на антитела, като ензимно-свързани имуносорбентни анализи (ELISA) и радиоимунни изследвания (RIA), всеки химикал следва, преди започване на действителното изпитване на химикалите, да се анализира за потенциал да пречи на системата за измерване на хормони (Допълнение III от доклада за валидирането (4)), защото някои химикали могат да пречат на тези изпитвания (17). Ако се наблюдава пречене  $\geq 20$  % от основното производство на хормони за Т и/или Е2, както е определено от анализа на хормони, върху всички разреждания на изходния разтвор на изпитвания химикал независимо се провежда изпитването за влияние на химикали върху изследването за хормони (като описаното в раздел 5.0 от

<sup>(1)</sup> Забележка: Ако се изисква извличане, за всяко извличане се извършват три повторения на измерванията. Всяка проба се извлича само веднъж.

Допълнение III към доклада за валидирането (4)) за определяне на праговата доза, при която се наблюдава значително пречене ( $\geq 20\%$ ). Ако влиянието е по-малко от  $30\%$ , резултатите могат да бъдат коригирани с влиянието. Ако преченето превишава  $30\%$ , данните са невалидни и данните при тези концентрации трябва да се игнорират. Ако значително пречене на даден изпитван химикал върху системата за измерване на хормони се наблюдава при повече от една концентрация, която не е цитотоксична, следва да се използва различна система за измерване на хормони. С цел да се избегнат пречения от замърсяване с химикали се препоръчва хормоните да се извличат от средата, като се използва подходящ разтворител — възможни методи могат да бъдат намерени в доклада за валидирането (4).

Таблица 1

**Критерии за параметрите за системата за измерване на хормони**

| Параметър                                                                 | Критерий                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Чувствителност на метода за измерване                                     | Граница на количествено определяне (LOQ)<br>T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml <sup>(a)</sup>                                                                                                                             |
| Ефикасност на извличане на хормоните (само когато е необходимо извличане) | Средният процент на аналитичен добив (въз основа на трикратно повторение на измерването) за внесените добавки от хормони следва да не се отклонява с повече от $30\%$ от внесеното количество.                    |
| Пречене на химикала (само системи за измерване на основата на антитела)   | Не следва да се наблюдава съществена кръстосана реактивност с някой от хормоните, произвеждани от клетките ( $\geq 30\%$ от основното производство на хормони за съответния хормон) <sup>(b)</sup> <sup>(c)</sup> |

<sup>(a)</sup> Бележка: Граничните стойности на измерване за дадения метод се основават на стойностите на основното производство на хормони, дадени в таблица 5, и са основани на параметрите. Ако може да се постигне по-голямо основно производство на хормони, границата може да бъде по-голяма.

<sup>(b)</sup> При някои антитела на T и E2 може да се наблюдава по-голям процент на кръстосана реактивност, съответно с андростендион и естрон. В такива случаи е невъзможно да се определят точно ефектите върху  $17\beta$ -HSD. Въпреки това данните могат все пак да предоставят полезна информация относно ефектите върху производството на естрогени или андрогени като цяло. В такива случаи данните следва да бъдат изразени като андрогенни/естрогенни отговори, а не като E2 и T.

<sup>(c)</sup> Те включват: холестерол, прегненолон, прогестерон, 11-деоксикортикостерон, кортикостерон, алдостерон,  $17\alpha$ -прегненолон,  $17\alpha$ -прогестерон, деоксикортизол, кортизол, дехидроепиандростерон (DHEA), андростендион, естрон.

**Изпитване за пригодност на лабораторията**

33. Преди изпитването на неизвестни химикали, лабораторията трябва да докаже, че е в състояние да постигне и поддържа подходящи условия за клетъчните култури и условия на изпитването, изисквани за успешното провеждане на изследването, чрез независимо провеждане на изпитването за пригодност на лабораторията. Тъй като извършването на дадено изследване е пряко свързано с персонала на лабораторията, извършващо изследването, тези процедури следва да бъдат частично повтаряни, ако настъпи промяна в персонала на лабораторията.
34. Това изпитване за пригодност се провежда при същите условия, изброени в параграфи 38—40, чрез експозиция на клетки на 7 нарастващи концентрации на силни, умерено силни и слаби индуктори и инхибитори, както и на отрицателен химикал (вж. таблица 2). По-конкретно, химикалите, които ще бъдат изпитвани, включват силния индуктор форсколин (CAS № 66575-29-9); силния инхибитор прохлораз (CAS № 67747-09-5); умерено силния индуктор атразин (CAS № 1912-24-9); умерено силния инхибитор аминоклутетимид (CAS № 125-84-8); слабия индуктор (производство на E2) и слабия инхибитор (производство на T) бисфенол А (CAS № 80-05-7); и отрицателния химикал човешки хорионен гонадотропин (HCG) (CAS № 9002-61-3), както е показано в таблица 2. Независимо се провеждат изпитвания с отделни плаки за всички химикали, като за целта се използва форматът, показан в таблица 6. Една плака за КК (таблица 4, параграфи 36—37) следва да бъде включена във всяко ежедневно независимо провеждане на изпитване с химикалите за изпитването за пригодност.

Таблица 2

**Химикали за изпитването за пригодност и концентрации на експозиция**

| Химикал за изпитването за пригодност | Концентрации на изпитване [ $\mu$ M]              |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Прохлораз                            | 0 <sup>(a)</sup> , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 |
| Форсколин                            | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30   |

| Химикал за изпитването за пригодност | Концентрации на изпитване [ $\mu\text{M}$ ]     |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Атразин                              | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |
| Аминоглутетимид                      | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |
| Бисфенол А                           | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |
| HCG                                  | 0 <sup>(a)</sup> , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |

<sup>(a)</sup> Контрола на разтворител (DMSO) (0), 1  $\mu\text{l}$  DMSO/гнездо

Експозицията на H295R на химикали за изпитването за пригодност следва да се извърши в 24-гнездови плаки по време на изпитването за пригодност на лабораторията. Дозирането е в  $\mu\text{M}$ , за всички дози на изпитвания химикал. Дозите следва да бъдат прилагани в DMSO при 0,1 % v/v на гнездо. Изпитването за всички изпитвани концентрации следва да бъде провеждано трикратно (таблица 6). Независимо се провеждат изпитвания с отделни плаки за всеки химикал. Една плака за КК се включва във всяко ежедневно независимо провеждане на изпитване.

35. Анализите на жизнеспособността на клетките и на хормоните следва да се извършват както е предвидено в параграфи 42 до 46. Праговата стойност (най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект, LOEC) и решението за класифициране следва да бъдат докладвани и сравнени със стойностите в таблица 3. Данните се считат за приемливи, ако отговарят на LOEC и решенията за класифициране в таблица 3.

Таблица 3

**Прагови стойности (LOEC) и решения за класифициране за химикалите за изпитването за пригодност**

|                 | CAS №      | LOEC [ $\mu\text{M}$ ] |                | Решение за класифициране     |               |
|-----------------|------------|------------------------|----------------|------------------------------|---------------|
|                 |            | T                      | E2             | T                            | E2            |
| Прохлораз       | 67747-09-5 | $\leq 0.1$             | $\leq 1.0$     | + <sup>(a)</sup> (Потискане) | + (Потискане) |
| Форсколин       | 66575-29-9 | $\leq 10$              | $\leq 0.1$     | + (Индукция)                 | + (Индукция)  |
| Атразин         | 1912-24-9  | $\leq 100$             | $\leq 10$      | + (Индукция)                 | + (Индукция)  |
| Аминоглутетимид | 125-84-8   | $\leq 100$             | $\leq 100$     | + (Потискане)                | + (Потискане) |
| Бисфенол А      | 80-05-7    | $\leq 10$              | $\leq 10$      | + (Потискане)                | + (Индукция)  |
| HCG             | 9002-61-3  | не е приложимо         | не е приложимо | Отрицателен                  | Отрицателен   |

<sup>(a)</sup> +, положителен

не е приложимо: не е приложимо, тъй като не следва да настъпват изменения след експозиция на концентрации на отрицателен контрол, които не са цитотоксични.

**Плака за контрол на качеството**

36. Плаката за контрол на качеството (КК) се използва за проверка на параметрите на H295R клетките при стандартни условия за отглеждане на културата и за създаване на база данни от предходни изследвания за концентрации на хормони в контроли на разтворител, положителни и отрицателни контроли, както и други мерки за КК във времето.
- Параметрите на H295R клетките следва да се оценяват с използване на плака за КК за всяка нова партида от АТСС или след използването на предварително замразени количества клетки за първи път, освен ако независимо провеждане на изпитването за пригодност на лабораторията (параграфи 32—34) е било с тази партида клетки.
  - Плаката за КК осигурява цялостна оценка на условията на изследването (напр. клетъчна жизнеспособност, контроли на разтворител, положителни и отрицателни контроли, както и вариране в рамките на дадено изследване и между различните изследвания) при изпитване на химикали и следва да бъде част от всяко независимо провеждане на изпитването.
37. Изпитването за КК се извършва в 24-гнездова плака и следва същите процедури за инкубация, дозиране, клетъчна жизнеспособност/цитотоксичност, извличане на хормони и анализ на хормони, описани в параграфи 38—46 за изпитването на химикали. Плаката за КК съдържа празни проби, контролни проби на разтворител и две

концентрации на известен индуктор (форсколин, 10, 1  $\mu\text{M}$ ) и инхибитор (прохлораз, 0,1, 1  $\mu\text{M}$ ) на синтеза на E2 и T. В допълнение, в избрани гнезда се използва MeOH като положителна контрола за изследването за жизнеспособност/цитотоксичност. Подробно описание на структурата на плаката е представено в таблица 4. Критериите, на които трябва да отговаря плаката за КК, са изброени в таблица 5. Изискването за минимално основно производство на хормони за T и E2 следва да бъде изпълнено както за гнездата с контролните проби на разтворител, така и в тези с празните проби.

Таблица 4

**Структура на плаката за контрол на качеството за изпитване на параметрите на неекспонирани H295R клетки и H295R клетки, експонирани на известни инхибитори (PRO = прохлораз) и стимулатори (FOR = форсколин) на производството на E2 и T. След прекратяването на опита с експозицията и отстраняването на средата се добавя 70 % разтвор на метанол към всички гнезда с MeOH, за да служи като положителна контрола за цитотоксичност (вж. изследването за цитотоксичност в допълнение III към доклада за валидирането (4))**

|   | 1                                      | 2                                      | 3                                      | 4                                                                 | 5                                                                 | 6                                                                 |
|---|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| A | Празна проба <sup>(a)</sup>            | Празна проба <sup>(a)</sup>            | Празна проба <sup>(a)</sup>            | Празна проба <sup>(a)</sup><br>(+ MeOH) <sup>(b)</sup>            | Празна проба <sup>(a)</sup><br>(+ MeOH) <sup>(b)</sup>            | Празна проба <sup>(a)</sup><br>(+ MeOH) <sup>(b)</sup>            |
| B | DMSO <sup>(c)</sup><br>1 $\mu\text{l}$ | DMSO <sup>(c)</sup><br>1 $\mu\text{l}$ | DMSO <sup>(c)</sup><br>1 $\mu\text{l}$ | DMSO <sup>(c)</sup><br>1 $\mu\text{l}$<br>(+ MeOH) <sup>(b)</sup> | DMSO <sup>(c)</sup><br>1 $\mu\text{l}$<br>(+ MeOH) <sup>(b)</sup> | DMSO <sup>(c)</sup><br>1 $\mu\text{l}$<br>(+ MeOH) <sup>(b)</sup> |
| C | FOR 1 $\mu\text{M}$                    | FOR 1 $\mu\text{M}$                    | FOR 1 $\mu\text{M}$                    | PRO 0,1 $\mu\text{M}$                                             | PRO 0,1 $\mu\text{M}$                                             | PRO 0,1 $\mu\text{M}$                                             |
| D | FOR 10 $\mu\text{M}$                   | FOR 10 $\mu\text{M}$                   | FOR 10 $\mu\text{M}$                   | PRO 1 $\mu\text{M}$                                               | PRO 1 $\mu\text{M}$                                               | PRO 1 $\mu\text{M}$                                               |

<sup>(a)</sup> Клетките в гнездата с празни проби получават само среда (т.е. без разтворител).

<sup>(b)</sup> Добавя се метанол (MeOH) **след** прекратяване на експозицията и отстраняване на средата от тези гнезда.

<sup>(c)</sup> Контрола на разтворител DMSO (1  $\mu\text{l}$ /гнездо).

Таблица 5

#### Критерии за параметрите за плаката за контрол на качеството

|                                                                  | T                  | E2                  |
|------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|
| Основно производство на хормони в контролата на разтворител (SC) | $\geq 5$ пъти LOQ  | $\geq 2,5$ пъти LOQ |
| Индукция (10 $\mu\text{M}$ форсколин)                            | $\geq 1,5$ пъти SC | $\geq 7,5$ пъти SC  |
| Потискане (1 $\mu\text{M}$ прохлораз)                            | $\leq 0,5$ пъти SC | $\leq 0,5$ пъти SC  |

#### ПРОЦЕДУРА ЗА ЕКСПОЗИЦИЯ НА ХИМИКАЛ

38. Предварително инкубираните клетки се изваждат от инкубатора (параграф 21) и се проверяват под микроскоп, за да се гарантира, че са в добро състояние (прикрепване, морфология) преди дозирането.
39. Клетките се поставят в камера за биологична безопасност, средата с добавки се отстранява и се заменя с нова среда с добавки (1 ml/гнездо). DMSO е предпочитаният разтворител за настоящия метод за изпитване. Въпреки това, ако съществуват причини за използване на други разтворители, следва да бъде дадена научна обосновка. Клетките се експонират на изпитвания химикал чрез прибавяне на 1  $\mu\text{l}$  от подходящия изходен разтвор в DMSO (виж допълнение II към доклада за валидирането (4)) в 1 ml среда с добавки (обем на гнездото). Това води до крайна концентрация от 0,1 % DMSO в гнездата. За да се осигури подходящо смесване, като цяло е за предпочитане подходящият

изходен разтвор на изпитвания химикал в DMSO да се смесва със средата с добавки за получаване на желаната крайна концентрация за всяка доза, и сместа да се добавя към всяко гнездо веднага след отстраняването на старата среда. Ако се използва този вариант, концентрацията на DMSO (0,1 %) следва да остане еднаква във всички гнезда. Гнездата, съдържащи двете най-високи концентрации, се проверяват визуално, чрез използване на стереоскопичен микроскоп, за образуване на утайки или за помътняване като показател за непълна разтворимост на изпитвания химикал. Ако се наблюдават такива обстоятелства (помътняване, образуване на утайки), съдържащите следващите по-ниски концентрации гнезда също се преглеждат (и т.н.) и концентрациите, които не са напълно разтворени, трябва да бъдат изключени от по-нататъшна оценка и анализ. Плаката се връща в инкубатор при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> във въздушна атмосфера за 48 часа. Структурата на плаката с изпитвания химикал е показана в таблица 6. Изходни разтвори 1—7 показват поставяне на увеличаващи се дози от изпитвания химикал.

Таблица 6

**Схема на дозиране за експозиция на H295R клетки на изпитвани химикали в 24-гнездова плака**

|   | 1                 | 2                 | 3                 | 4                 | 5                 | 6                 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A | DMSO              | DMSO              | DMSO              | Изходен разтвор 4 | Изходен разтвор 4 | Изходен разтвор 4 |
| B | Изходен разтвор 1 | Изходен разтвор 1 | Изходен разтвор 1 | Изходен разтвор 5 | Изходен разтвор 5 | Изходен разтвор 5 |
| C | Изходен разтвор 2 | Изходен разтвор 2 | Изходен разтвор 2 | Изходен разтвор 6 | Изходен разтвор 6 | Изходен разтвор 6 |
| D | Изходен разтвор 3 | Изходен разтвор 3 | Изходен разтвор 3 | Изходен разтвор 7 | Изходен разтвор 7 | Изходен разтвор 7 |

40. След 48 часа експонираните плаки се изваждат от инкубатора и всяко гнездо се проверява под микроскоп за състоянието на клетките (прикрепване, морфология, степен на сливане) и признаци на цитотоксичност. Средата от всяко гнездо се разделя на два равни обема (около 490 µl всеки) и се прехвърля в два отделни флакона, етикетирани по подходящ начин (т.е. една аликвотна част за осигуряване на резервна проба за всяко гнездо). За предотвратяване на изсушаването на клетките средата се отстранява (по един ред или колона наведнъж) и се заменя със средата за изследването за клетъчна жизнеспособност/цитотоксичност. Ако клетъчната жизнеспособност/цитотоксичността не трябва да се измерва веднага, 200 µl PBS с Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> се добавят към всяко гнездо. Средите се замразяват при – 80 °C до по-нататъшното им обработване за анализ на концентрациите на хормони (вж. параграфи 44—46). Т и Е2 в среда, съхранявани при температура от – 80 °C, по принцип са стабилни за период от най-малко 3 месеца, но независимо от това стабилността на хормоните при съхранение следва да бъде документирана в рамките на всяка лаборатория.
41. Веднага след отстраняването на средата, клетъчната жизнеспособност/цитотоксичността се определят за всяка плака с определена експозиция.

**Определяне на клетъчната жизнеспособност**

42. Може да бъде извършено изследване по избор за клетъчна жизнеспособност/цитотоксичност за определяне на потенциалното въздействие на изпитвания химикал върху клетъчната жизнеспособност. Изследването следва да бъде в състояние да осигурява вярно измерване на процента на жизнеспособните клетки, намиращи се в гнездото, или трябва да се докаже, че то е пряко сравнимо с (линейна функция от) изпитване Live/Dead® (вж. приложение III от доклада за валидиране (4)). Алтернативно изследване, за което е доказано, че е равностойно, е изпитването с МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид] (18). Оценката на жизнеспособността на клетките по горепосочените методи е относително измерване, което не показва непременно линейни зависимости с абсолютния брой клетки в дадено гнездо. Поради това анализаторът следва да извърши субективна паралелна визуална оценка на всяко гнездо и следва да бъдат заснети и архивирани цифрови изображения на контролните проби на разтворител и двете най-високи концентрации, които не са цитотоксични, за да може по-късно да се извърши оценка на истинската плътност на клетките, ако това се изисква. Ако от визуална инспекция или от показване с изследване за жизнеспособност/цитотоксичност изглежда, че има нарастване на броя на клетките, видимото нарастване трябва да бъде проверено. Ако при проверка се установи нарастване на броя на клетките, това трябва да бъде посочено в доклада от изпитването. Клетъчната жизнеспособност се изразява по отношение на средния отговор от контролните проби на разтворителя, за който се счита, че е за 100 % жизнеспособни клетки, и се изчислява по начин, подходящ за използването изследване за жизнеспособност/цитотоксичност. За изпитването с МТТ може да се използва следната формула:

% **жизнеспособни клетки** = (отговор в гнездото – среден отговор в третиране с MeOH гнезда [= 100 % мъртви]) ÷ (среден отговор в гнезда със SC – среден отговор в третиране с MeOH гнезда [= 100 % мъртви])

43. Гнездата с жизнеспособност, по-ниска от 80 % в сравнение със средната жизнеспособност в SC (= 100 % жизнеспособност), не следва да се включват в окончателния анализ на данните. Потискането на стероидогенезата, протичащо в присъствието на почти 20 % цитотоксичност, следва да бъде внимателно оценявано, за да се гарантира, че цитотоксичността не е причината за потискането.

#### Анализ на хормони

44. За анализа на Т и Е2 всяка лаборатория може да използва система за измерване на хормони по свой избор. Резервните аликвотни части от среда от всяка група за третиране могат да бъдат използвани при изготвянето на разреждания за привеждане на концентрацията в рамките на линейната част от стандартната крива. Както е отбелязано в параграф 29, всяка лаборатория трябва да докаже съответствието на своята система за измерване на хормони (напр. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) с критериите за КК като, преди да извърши независимо провеждане на изпитване за КК или преди изпитването на химикали, анализира белязана проба от среда с добавки с вътрешна контрола с хормон като внесена добавка. С цел да се гарантира, че компонентите на системата за изпитване не пречат на измерването на хормони, може да се наложи хормоните да бъдат извлечени от средите преди тяхното измерване (вж. параграф 30 за условията, при които се изисква или не се изисква извличане). Препоръчително е извличането да се извършва съгласно процедурите в допълнение III към доклада за валидирането (4).
45. Ако за измерване на производството на хормони се използва търговски комплект за изпитване, анализът на хормони трябва да се извършва съгласно наръчниците, предоставени от производителя на комплекта за изпитване. Повечето производители имат уникална процедура, по която се извършват анализите на хормони. Разрежданията на пробите трябва да бъдат коригирани по такъв начин, че очакваните концентрации на хормони за контролите на разтворител да попадат в центъра на линейния обхват на стандартната крива на отделното изследване (допълнение III към доклада за валидирането (4)). Стойностите извън линейната част на стандартната крива следва да бъдат отхвърлени.
46. Крайните концентрации на хормони се изчисляват по следния начин:

Пример:

|                                           |                                                                                                          |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Извлечени:                                | 450 µl среда                                                                                             |
| Възстановени в:                           | 250 µl буфер, използван при изследването                                                                 |
| Разреждане при изследването:              | 1:10 (за да може пробата да попадне в рамките на линейния обхват на стандартната крива)                  |
| Концентрация на хормони при изследването: | 150 pg/ml (вече коригирана до концентрация на ml изследвана проба)                                       |
| Добив:                                    | 89 %                                                                                                     |
| Крайна концентрация на хормони =          | (Концентрация на хормони (на ml) ÷ добив) (коефициент на разреждане)                                     |
| Крайна концентрация на хормони =          | $(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10 = 936,3 \text{ pg/ml}$ |

#### Избор на концентрации на изпитване

47. Изследването трябва да бъде извършено чрез най-малко две независими провеждания. Освен ако предварителна информация, като например информацията за границите на разтворимост или за цитотоксичността, предоставя основа за избора на концентрации на изпитване, препоръчва се концентрациите на изпитване при първоначалното независимо провеждане да бъдат разположени на интервали от  $\log_{10}$  с максимална концентрация  $10^{-3}$  M. Ако химикалът е разтворим и не е цитотоксичен при никоя от изпитваните концентрации, и първоначалното независимо провеждане е дало отрицателен резултат при всички концентрации, тогава това трябва да бъде потвърдено с още едно независимо провеждане, като се използват същите условия, както при първоначалното независимо провеждане (таблица 7). Ако резултатите от първоначалното независимо провеждане са *неясни* (т.е. кратността на изменението е статистически значима по отношение на SC само при една концентрация) или положителни (т.е. кратността

на измененията е статистически значима при две или повече съседни концентрации), изпитването следва да бъде повторено, както е посочено в таблица 7, чрез уточняване на избраните концентрации на изпитване. Концентрациите на изпитване при второто и третото независими провеждания (ако е приложимо) следва да се коригират въз основа на резултатите от концентрациите от първоначалното независимо провеждане, при които има проявен ефект, като същите се обграждат с концентрации, разположени на интервал  $1/2\text{-log}$  (например ако в резултат на първоначалното независимо провеждане при концентрации 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000  $\mu\text{M}$  има получена индукция при концентрации 1 и 10  $\mu\text{M}$ , концентрациите на изпитване при второто независимо провеждане трябва да бъдат 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{M}$ ), освен ако трябва да бъдат използвани по-ниски концентрации за постигане на LOEC. В последния случай при второто независимо провеждане следва да се използват най-малко пет концентрации под най-ниската концентрация, изпитана при първоначалното независимо провеждане, с използване на скала с интервали от  $1/2\text{-log}$ . Ако при второто независимо провеждане не се потвърди първоначалното независимо провеждане (т.е. не се получи статистически значим резултат при концентрация, при която преди това е имало положителен резултат  $\pm 1$  интервал на концентрация), следва да бъде проведен трети опит, с използване на първоначалните условия на изпитване. Неясните резултати от първоначалното независимо провеждане се смятат за отрицателни, ако наблюдаваният ефект не е бил потвърден в никое от последващите независими провеждания. Неясните резултати се смятат за положителен отговор (ефект), когато отговорът може да се потвърди в най-малко още едно независимо провеждане в рамките на  $\pm 1$  интервал на концентрация (вж. раздел 55 за процедурата за тълкуване на данните).

Таблица 7

**Матрица на решенията при възможни сценарии с резултати**

| Независимо провеждане 1        | Независимо провеждане 2      |                      | Независимо провеждане 3      |                      | Решение              |                      |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Сценарий                       | Решение                      | Сценарий             | Решение                      | Сценарий             | Положителен резултат | Отрицателен резултат |
| Отрицателен резултат           | Потвърждаване <sup>(a)</sup> | Отрицателен резултат | Спиране                      |                      |                      | X                    |
| Отрицателен резултат           | Потвърждаване <sup>(a)</sup> | Положителен резултат | Уточняване <sup>(b)</sup>    | Отрицателен резултат |                      | X                    |
| Неясен резултат <sup>(c)</sup> | Уточняване <sup>(b)</sup>    | Отрицателен резултат | Потвърждаване <sup>(a)</sup> | Отрицателен резултат |                      | X                    |
| Неясен резултат <sup>(c)</sup> | Уточняване <sup>(b)</sup>    | Отрицателен резултат | Потвърждаване <sup>(a)</sup> | Положителен резултат | X                    |                      |
| Неясен резултат <sup>(c)</sup> | Уточняване <sup>(b)</sup>    | Положителен резултат |                              |                      | X                    |                      |
| Положителен резултат           | Уточняване <sup>(b)</sup>    | Отрицателен резултат | Потвърждаване <sup>(a)</sup> | Положителен резултат | X                    |                      |
| Отрицателен резултат           | Потвърждаване <sup>(a)</sup> | Положителен резултат | Уточняване <sup>(b)</sup>    | Положителен резултат | X                    |                      |
| Положителен резултат           | Уточняване <sup>(b)</sup>    | Положителен резултат | Спиране                      |                      | X                    |                      |

<sup>(a)</sup> Потвърждаване на предходното независимо провеждане, като се използва същият план за извършване на опита.

<sup>(b)</sup> Повтаряне на независимото провеждане при интервал на концентрациите  $1/2\text{-log}$  (обграждащ концентрацията, която при изпитването е показала значими различия в предходния опит).

<sup>(c)</sup> Различията в кратността на измененията при една концентрация са статистически значими по отношение на SC.

**Контрол на качеството при плаката за изпитване**

48. В допълнение към критериите за плаката за КК съществуват и други критерии за качество, които трябва да бъдат спазени, и които се отнасят до приемливите колебания между гнездата за повторение, повтаряните опити, линейността и чувствителността на системите за измерване на хормони, варирането между измерванията на хормоните при повторенията в рамките на една и съща проба и процента на аналитичен добив за внесените добавки от хормони след извличането на средата (ако е приложимо; вж. параграф 30 относно изискванията за извличане) и тези критерии са дадени в Таблица 8. Данните трябва да попадат в допустимите обхвати, определени за всеки параметър, който трябва да се вземе предвид за последваща оценка. Ако тези критерии не са спазени, електронната таблица следва да отбележи, че критериите за КК не са били спазени за въпросната проба и пробата следва да се анализира отново, или да не бъде включена в набора от данни.

Таблица 8

**Допустими обхвати и/или колебания (%) за параметрите в плаките за изпитване при изследване в H295R клетки**

(LOQ: Граница на количествено определяне на системата за измерване на хормони. CV: Коефициент на вариация;  
SC: Контрола на разтворител; DPM: Разпадания за минута)

|                                                                                     | Сравнение между                                       | T                     | E2           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|--------------|
| Основно производство на хормони в SC                                                | Кратност спрямо LOQ, по-голяма от                     | ≥ 5-кратна            | ≥ 2,5-кратна |
| Опити с експозиция — CV в рамките на плаката за SC (гнезда за повторение)           | Абсолютни концентрации                                | ≤ 30 %                | ≤ 30 %       |
| Опити с експозиция — CV между плаките за SC (повтаряни опити)                       | Кратност на измененията                               | ≤ 30 %                | ≤ 30 %       |
| Система за измерване на хормони — Чувствителност                                    | Кратност на откриваемите изменения по отношение на SC | ≥ 5-кратна            | ≥ 2,5-кратна |
| Система за измерване на хормони — CV на повтаряните измервания за SC <sup>(a)</sup> | Абсолютни концентрации                                | ≤ 25 %                | ≤ 25 %       |
| Извличане на средата — добив на вътрешен <sup>3</sup> H стандарт (ако е приложимо)  | DPM:                                                  | ≥ 65 % от номиналното |              |

(<sup>a</sup>) Отнася се за повтаряни измервания на същата проба

**АНАЛИЗ НА ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ****Анализ на данни**

49. За да се оцени относителното увеличение/намаление на измененото по химичен път производство на хормони, резултатите следва да бъдат стандартизирани спрямо средната стойност на SC за всяка плака за изпитване и изразени като изменения по отношение на SC във всяка плака за изпитване. Всички данни следва да бъдат изразени като средна стойност ± 1 стандартно отклонение (SD).
50. Само данните за хормони от гнезда, в които цитотоксичността е била под 20 %, следва да бъдат включени в анализа на данните. Относителните изменения следва да бъдат изчислявани по следния начин:

**Относително изменение** = (Концентрация на хормони във всяка плака) ÷ (Средна концентрация на хормони във всички гнезда с контрола на разтворител).

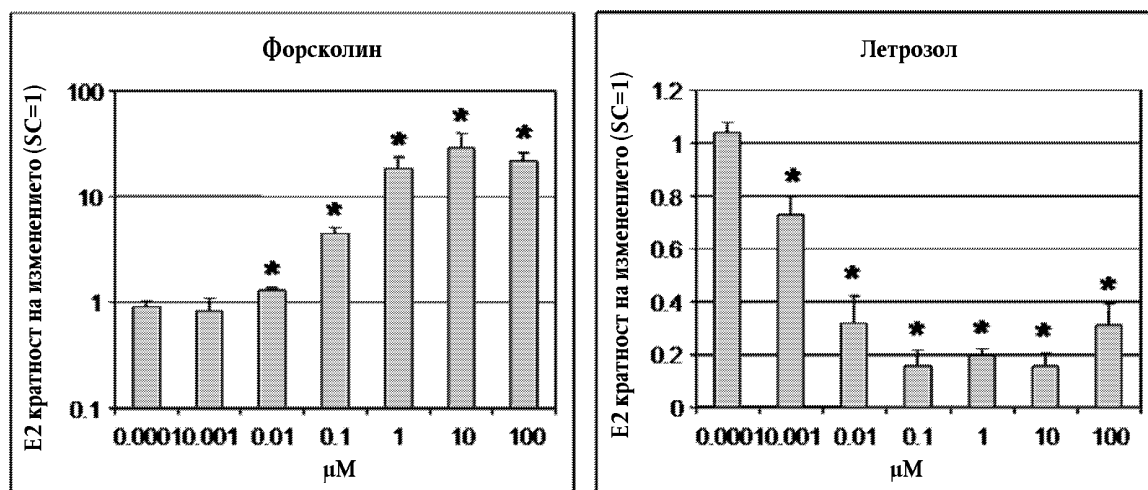
51. Ако от визуална инспекция на гнездото или от показване с изследване за жизнеспособност/цитотоксичност, описано в параграф 42, изглежда, че има нарастване на броя на клетките, видимото нарастване трябва да бъде проверено. Ако при проверка се установи нарастване на броя на клетките, това трябва да бъде посочено в доклада от изпитването.
52. Преди извършване на статистически анализи следва да бъдат оценени допусканията за нормалност и хомогенност на дисперсията. Нормалността следва да се оценява, като се използват графики за вероятности със стандартно разпределение или друг подходящ статистически метод (например изпитване на Shapiro-Wilk). Ако данните (кратност на измененията) не са с нормално разпределение, следва да се направи опит за трансформация на данните с цел доближаване до нормално разпределение. Ако данните са с нормално разпределение или се доближават до нормално разпределение, различията между групите с концентрация на химикал и контролите на носител следва да се анализират чрез използване на параметрично изпитване (напр. изпитване на Dunnett) като *концентрацията* е независимата променлива, а *отговорът* (кратност на измененията) е зависимата променлива. Ако данните не са с нормално разпределение, следва да бъде използвано подходящо непараметрично изпитване (като например изпитване на Kruskal Wallis или изпитване с рангови данни на Steel). Различията се считат за значими при  $p \leq 0,05$ . Статистически оценки се правят въз основа на средни стойности за всяко гнездо, които представляват независими точки с данни от повторения. Очаква се, че поради големия интервал между дозите при първоначалното независимо провеждане (скала  $\log_{10}$ ) в много случаи няма да е възможно да се опишат ясни зависимости концентрация-отговор, при които двете най-големи дози да са в линейната част на сигмоидната крива. Следователно при първоначалното независимо провеждане или при всякакви други набори от данни, за които е изпълнено това условие (например в случаите, когато не може да бъде оценена максималната ефикасност), се използва статистика с фиксирана променлива от тип I, както е описано по-горе.

53. Когато повече от две точки с данни са разположени върху линейната част на кривата и когато максималните ефикасности могат да бъдат изчислени — както се очаква при някои от 2-рите независими провеждания, които са при интервали в полулогаритмичен мащаб на концентрациите на експозиция — следва за изчисляване на концентрациите, при които се наблюдава ефект (напр. EC50 и EC20), да се използва Probit, Logit или друг подходящ регресионен модел.
54. Резултатите трябва да бъдат представени както в графичен (стъббовидна диаграма, представляваща средната стойност  $\pm 1$  SD), така и в табличен вид (LOEC/NOEC, посока на ефекта и сила на максималния отговор, който е частта доза-отговор от данните) (вж. фигура 3 за пример). Оценката на данните се счита за валидна само ако се основава на най-малко две независими провеждания. Опитът или независимото провеждане се считат за независими, ако са извършени на различна дата с използване на нов набор от разтвори и контроли. Използваният при независими провеждания 2 и 3 обхват от концентрации (ако е необходимо) може да се приспособи въз основа на резултатите от независимо провеждане 1, с цел по-добро определяне на обхвата доза-отговор, съдържащ LOEC (вж. параграф 47).

Фигура 3

**Пример за представянето и оценката на данните, получени по време на извършването на изследването в H295R клетки, в графичен и в табличен вид.**

Звездичките показват статистически значими разлики от контролата на разтворител ( $p < 0,05$ ). LOEC: Най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект; Максимално изменение: Максимална сила на отговора, наблюдавана при която и да е концентрация спрямо средната стойност на отговора при SC (= 1)



| Химикал   | LOEC  | Максимално изменение |
|-----------|-------|----------------------|
| Форсколин | 0,01  | 0,15 пъти            |
| Летрозол  | 0,001 | 29 пъти              |

**Процедура за анализ на данните**

55. Изследваният химикал се оценява като положителен, ако кратността на индукцията от стойността за контролата на разтворител е статистически значима ( $p \leq 0,05$ ) при две съседни концентрации в най-малко две независими провеждания (таблица 7). Изпитваният химикал се счита за отрицателен след две независими провеждания с отрицателен резултат, или след три независими провеждания, включващи две независими провеждания с отрицателен и едно с неясен или положителен резултат. Ако данните, получени в резултат от три независими опита, не покриват критериите за решение, изброени в таблица 7, опитните резултати не могат да бъдат тълкувани. Резултатите при концентрации, превишаващи границата на разтворимост, или при цитотоксични концентрации не следва да бъдат включвани в тълкуването на резултатите.

**Доклад от изпитването**

56. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

*Извършваща изпитвания лаборатория*

- Наименование и местоположение на лабораторията;
- Ръководител на изследването и друг персонал, и отговорностите им във връзка с изследването;
- Дати, на които е започнало и приключило изследването;

*Изпитван химикал, реагенти и контроли*

- Идентичност (наименование/CAS №, както е подходящо), източник, партида/номер на партидата, идентичност, чистота, доставчик и характеризиране на изпитвания химикал, реагентите и контролите;
- Физична природа и относими физични и химични свойства на изпитвания химикал;
- Условия на съхранение и метод и честота на изготвяне на изпитвани химикали, реагенти и контроли;
- Стабилност на изпитвания химикал;

*Клетки*

- Източник и тип на клетките;
- Брой клетъчни пасаж (идентификатор на клетъчни пасаж) за клетките, използвани в изпитването;
- Описание на процедурите за поддържане на клетъчните култури;

*Изисквания преди изпитването, ако е приложимо*

- Описание и резултати от изпитването за пречене на изследването за хормони от страна на химикала;
- Описание и резултати от измерванията на ефикасността на извличането на хормони;
- Стандартни и калибрационни криви за всички аналитични изследвания, които трябва да бъдат извършени;
- Граници на откриване за избраните аналитични изследвания;

*Условия на изпитването*

- Състав на средата;
- Концентрация на изпитвания химикал;
- Клетъчна плътност (очаквана или измерена концентрации на клетки след 24 часа и 48 часа)
- Разтворимост на изпитвания химикал (граница на разтворимост, ако е определена);
- Време и условия на инкубация;

*Резултати от изпитванията*

- Необработени данни за всяко гнездо с контрола и изпитвани химикали — всяко измерване от повторение е във формата на оригиналните данни, предоставяни от инструмента, използван за измерване на производството на хормони (например оптична плътност, флуоресцентни единици, DPM и т.н.);
- Валидиране на нормалността или обяснение на трансформирането на данните;
- Средни отговори  $\pm 1$  SD за всяко измерено гнездо;
- Данни за цитотоксичността (изпитвани концентрации, които са причинили цитотоксичността);
- Потвърждение, че са спазени изискванията за КК;
- Относителна промяна в сравнение с контрола на разтворител, коригирана за цитотоксичност;
- Стилбовидна диаграма, показваща относителното изменение (кратността) при всяка концентрация, SD и статистическата значимост, както е посочено в параграфи 49—54.

*Тълкуване на данните*

- Към резултатите се прилага процедурата за тълкуване на данните и се обсъждат констатациите;

*Обсъждане*

- Има ли в резултат от изследването множество показания за възможността данните за Т/Е2 да бъдат повлияни от непреки ефекти върху глюкокортикоидните и минералкортикоидните пътища?

*Заключения*

## ЛИТЕРАТУРА

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, в допълнение 2 към глава Б.54 от настоящото приложение
- (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 № 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](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 № 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](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](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) Глава Б.55 от настоящото приложение: Биологично изследване на Hershberger при плъхове: Краткосрочно скринингово изследване за (анти)андрогенни свойства.
- (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.
-

## Допълнение

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Сливане** означава позволеното за клетките покритие или разпространение върху средата за клетъчни култури или в нея.

**Химикал** означава вещество или смес.

**CV** означава коефициент на вариация и се определя като съотношение между стандартното отклонение на дадено разпределение и неговата средноаритметична стойност.

**CYP** означава цитохром P450 монооксигенази, семейство от гени и произведения от тях ензими, които участват в катализирането на голямо разнообразие от биохимични реакции, включително синтеза и метаболизма на стероидни хормони.

**DPM** означава разпадания в минута. Това е откритият в продължение на една минута брой атоми в определено количество радиоактивен материал, при които е настъпило разпадане.

**E2** е 17 $\beta$ -естрадиол, най-важният естроген при бозайниците.

**H295R** клетките са клетки от карцином на кората на надбъбреците при човека, които притежават физиологични характеристики на зонално недиференцирани фетални клетки от надбъбречната жлеза при човека, и които експресират всички ензими от стероидогенния път. Те са на разположение от ATCC.

**Среда за замразяване** се използва за замразяване и съхраняване на замразени клетки. Състои се от изходна среда плюс BD NuSerum и диметилсулфоксид.

**Линеен обхват** е обхватът в рамките на стандартната крива за дадена система за измерване на хормони, в който резултатите са пропорционални на концентрацията на присъстващия в пробата определяем компонент.

**LOQ** означава „граница за количествено определяне“ и представлява най-малкото количество на химикал, което може да бъде разграничено от липсата на този химикал (стойност на празната проба) в рамките на посочена граница на доверителен интервал. За целите на настоящия метод LOQ обикновено се определя от производителя на системите за изпитване, ако не е указана по друг начин.

**LOEC** е най-ниската концентрация, при която се наблюдава ефект, най-ниското равнище на концентрация, при което от статистическа гледна точка отговорът при изследването е различен от този при контролата на разтворител.

**NOEC** е концентрация без наблюдавано въздействие, която е най-високата изпитвана концентрация, ако при изследването не е получен положителен отговор.

**Пасаж** е броят пъти на разделяне на клетките след иницирането на култура от клетки от замразени количества. На първоначалния пасаж, инициран от замразените количества, се дава номер едно (1). Клетките, които са били разделени 1 път се наричат пасаж 2 и т.н.

**PBS** е фосфатно буфериран физиологичен разтвор на Dulbecco.

**Контрол на качеството**, съкратено КК, се отнася до мерките, необходими за осигуряване на валидни данни.

**Плака за контрол на качеството** е 24-гнездова плака, съдържаща две концентрации на положителни и отрицателни контроли за наблюдение на параметрите на нова партида от клетки или за предоставяне на положителните контроли за изследването, когато се изпитват химикали.

**Независимо провеждане** е независим опит, характеризирани с нов набор от разтвори и контроли.

**Изходна среда** е основата за приготвянето на други реагенти. Състои се от DMEM/F12 (смес в съотношение 1:1 от Dulbecco's Modified Eagle's Medium и Ham's F-12 Nutrient) в 15 mM буфер HEPES без фенолно червено или натриев бикарбонат. Натриев бикарбонат се добавя като буфер, вж. допълнение II към доклада за валидирането (4).

**Среда с добавки** се състои от изходна среда плюс BD Nu-Serum и ITS+ premium mix, вж. допълнение II към доклада за валидирането (4).

**Стероидогенеза** е път, водещ до синтез на различните стероидни хормони от холестерол. Няколко предшественици от пътя за синтез на стероиди, като прогестерон и тестостерон, сами по себе си са важни хормони, но също така служат и като прекурсори за хормони, произвеждани по-нататък по пътя за синтез.

**T** означава тестостерон, един от двата най-важни андрогена при бозайниците.

**Изпитван химикал** е всяко вещество или смес, изпитвано(а) с използване на настоящия метод за изпитване.

**Плака за изпитване** е плака, на която H295R клетки се експонират на изпитвани химикали. Плаките за изпитване съдържат контролата на разтворител и изпитвания химикал в седем равнища на концентрация трикратно.

**Трипсин 1X** е разреден разтвор на ензима трипсин, панкреатична серин-протеаза, използван за отделяне на клетките от плака за клетъчни култури, вж. Допълнение III към доклада за валидиране (4).

**Б.58. ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ГЕННИ МУТАЦИИ В СОМАТИЧНИ И ЗАРОДИШНИ КЛЕТКИ ПРИ ТРАНСГЕННИ ГРИЗАЧИ****УВОД**

1. Настоящият метод за изпитване е еквивалентен на насоките за изпитване на ОИСП (TG) 488 (2013). На разположение са методи на ЕС за изпитване за широк набор от изпитвания за мутации *in vitro*, чрез които могат да бъдат откривани хромозомни и/или генни мутации. Съществуват методи за изпитване за крайни точки *in vivo* (т.е., хромозомни аберации и непрограмиран синтез на ДНК); те обаче не измерват генни мутации. Изследванията за мутации при трансгенни гризачи (TGR) запълват нуждата от практически и широкодостъпни изпитвания *in vivo* за генни мутации.
2. Изследванията за мутации при TGR са разгледани подробно (24)(33). Те използват трансгенни плъхове и мишки, които съдържат множество копия на хромозомно интегрирани плазмидни или фагови вектори совалки. Трансгените съдържат репортерни гени за откриване на различни видове мутации, индуцирани *in vivo* от изпитвани химикали.
3. Мутациите, възникващи при гризачи, се отчитат чрез отделяне на трансгена и анализиране на фенотипа на репортерния ген в бактериален гостоприемник, в който репортерният ген липсва. Изследванията за генни мутации при TGR измерват мутациите, индуцирани в генетично неутрални гени, отделени от почти всички тъкани при гризачи. Тези изпитвания, следователно, заобикалят много от съществуващите ограничения, свързани с изследване на генна мутация *in vivo* в собствени гени (напр. ограничени тъкани, подходящи за анализ, положителен/отрицателен подбор по отношение на мутации).
4. Оценката на значимостта на доказателствения материал показва, че трансгените отговарят на мутагени по подобен начин на собствените гени, особено по отношение на откриването на заместване на двойка бази, мутации с изместване на рамката на разчитане и малки делеции и инсерции (24).
5. На Международните семинари относно изпитванията за генотоксичност (IWGT) е потвърдено включването на изследванията за генни мутации при TGR за откриване *in vivo* на генни мутации, и е препоръчан протокол за тяхното изпълнение (15)(29). Настоящият метод за изпитване се основава на тези препоръки. Допълнителен анализ в подкрепа на използването на настоящия протокол е на разположение в (16).
6. Очаква се, че в бъдеще може да съществува възможност за съчетаване на изследванията за генни мутации при TGR с изследвания за токсичност при повтарящи се дози (глава Б.7 от настоящото приложение). Въпреки това са необходими данни за гарантиране, че чувствителността на изследванията за генни мутации при TGR не се влияе от по-краткия едnodневен период между края на периода на прилагане и времето на пробовземане, както се прилага при изследвания за токсичност при повтарящи се дози, в сравнение с 3-дневния период, използван в изследванията за генни мутации при TGR. Също така са необходими данни, които да показват, че параметрите на изследванията при повтарящи се дози няма да бъдат неблагоприятно повлияни от използването на трансгенни породи гризачи вместо обичайни породи гризачи. Когато тези данни бъдат налични, настоящият метод за изпитване ще бъде актуализиран.
7. Определенията на ключови термини са дадени в допълнението.

**ПЪРВОНАЧАЛНИ СЪОБРАЖЕНИЯ**

8. Изследванията за генни мутации при TGR, за които има достатъчно налични данни за подкрепа на използването им в настоящия метод за изпитване, са: мишка, носеща бактериофаг, съдържащ *lacZ* (Muta™Mouse); мишка, носеща плазмид, съдържащ *lacZ*; мишка и плъх *gpt delta* (*gpt* и *Sp<sup>+</sup>*); мишка и плъх, носещи *lacI* (Big Blue®), извършвани при стандартни условия. В допълнение, изследването с положителна селекция на *cII* може да бъде използвано за оценка на мутациите в моделите Big Blue® и Muta™Mouse. Мутагенезата в моделите с TGR се оценява по принцип като честота на мутантите; ако е необходимо обаче, чрез молекулярен анализ на мутациите може да бъде предоставена допълнителна информация (вж. параграф 24).
9. Тези изпитвания за генна мутация *in vivo* при гризачи са особено важни за оценка на мутагенната опасност, поради това че отговорите при изследванията зависят от метаболизма *in vivo*, от фармакокинетиката, от процесите на репарация на ДНК и синтеза на ДНК чрез повредени участъци, въпреки че те могат да варират според вида, тъканта и вида увреждане на ДНК. Изследването *in vivo* за генни мутации е полезно за по-нататъшното проучване на мутагенен ефект, установен чрез система *in vitro*, както и за проследяване на резултатите от изпитвания, използващи други крайни точки *in vivo* (24). Освен че има причинно-следствена връзка с предизвикването на рак, генната мутация е относима крайна точка за прогнозиране на основани на мутация неракови заболявания на соматичните тъкани (12)(13), както и на болести, предавани чрез зародишната линия.

10. Ако има доказателства, че изпитваният химикал, или относим метаболит, не достига никоя от представляващите интерес тъкани, извършването на изследване за генни мутации при TGR не е подходящо.

#### ПРИНЦИП НА ИЗПИТВАНЕТО

11. В изследванията, описани в параграф 8, прицелният ген по произход е от бактерия или бактериофаг, и средството за отделяне от геномната ДНК при гризачи е чрез включването на трансгена в  $\lambda$  бактериофаг или плазмид като вектор совалка. Процедурата включва извличането на геномна ДНК от представляваща интерес тъкан от гризач, обработка *in vitro* на геномната ДНК (т.е. опаковане на  $\lambda$  вектори, или лигиране и електропорация на плаزمиди за отделяне на вектора совалка) и последващо откриване на мутации в бактерии гостоприемници при подходящи условия. При изследванията се използват неутрални трансгени, които могат да бъдат лесно изолирани от повечето тъкани.
12. Основният опит, свързан с генна мутация при TGR, включва третиране на гризач с химикал за определен период от време. Химикалите могат да се прилагат посредством всякакви подходящи пътища, включително имплантация (напр. изпитване на медицинско изделие). Общата продължителност на дозиране на дадено животно се нарича период на прилагане. Прилагането обикновено е последвано от период от време, предхождащ умъртвяването, през който химикалът не се прилага, и по време на който нерепарирани повреди в ДНК се фиксират в стабилни мутации. В литературата този период се нарича по различни начини — период на проява, период на фиксиране или период на експресия; краят на този период е моментът на пробовземането (15)(29). След като животното бъде умъртвено, геномната ДНК се изолира от представляващата интерес тъкан или тъкани и се пречиства.
13. Данните за отделна тъкан на животно от множество опаковки/лигирации обикновено се обобщават и честотата на мутантите като цяло се оценява с помощта на общо между  $10^5$  и  $10^7$  образуващи плака единици или образуващи колония единици. При използване на методи за положителна селекция общият брой образуващи плака единици се определя с отделен набор неселективни плаки.
14. Разработени са методи за положителна селекция за улесняване на откриването на мутации както в *gpt* гена [*gpt* delta мишка и плъх, *gpt*<sup>-</sup> фенотип (20)(22)(28)], така и в гена *lacZ* [*Muta*<sup>TM</sup>Mouse или *lacZ*, съдържащи се в плазмиди в мишки (3)(10)(11)(30)]; докато мутациите на гена *lacI* в животни Big Blue® се откриват чрез неселективен метод, с който мутантите се установяват чрез генериране на оцветени (в синьо) плаки. Методологията за положителна селекция позволява също така и откриване на точкови мутации, възникващи в гена *cII* от вектора совалка на  $\lambda$  бактериофага [Big Blue® мишка или плъх, и *Muta*<sup>TM</sup>Mouse (17)] и мутации чрез делеции в гените  $\lambda$  *red* и *gam* [*Spi*<sup>-</sup> селекция при *gpt* delta мишка или плъх (21)(22)(28)]. Честотата на мутантите се изчислява, като се раздели броят на плаките/плазмидите, съдържащи мутации в трансгена, на общия брой плаки/плазмиди, отделени от същата проба от ДНК. При изследванията за генни мутации при TGR честотата на мутантите е докладваният параметър. Освен това дадена честота на мутация може да се определи като дял от клетки, носещи независими мутации; за това изчисление се изисква корекция за клонална експанзия чрез определяне на първичната структура на изолираните мутанти (24).
15. Мутациите, отчитани в изследванията на *lacI*, *lacZ*, *cII* и *gpt* за точкова мутация, се състоят предимно от мутации чрез заместване на двойка бази, мутации с изместване на рамката на разчитане и малки инсерции/делеции. Относителният дял на тези типове мутации сред спонтанните мутации е подобен на този, който се наблюдава в собствения ген *Hprt*. Големи делеции са открити само при изследванията със селекция на *Spi*<sup>-</sup> и с плазмиди, съдържащи *lacZ* (24). Представляващите интерес мутации са мутации *in vivo*, които възникват при мишки или плъхове. Мутациите *in vitro* и *ex vivo*, които могат да възникнат по време на отделяне на фаг/плазмид, репликация или репарация, са относително редки и в някои системи могат да бъдат конкретно определени, или изключени от бактерията гостоприемник/системата за положителна селекция.

#### ОПИСАНИЕ НА МЕТОДА

##### Подготовка

##### Избор на животински вид

16. Понастоящем са налични разнообразни модели за откриване на генни мутации в трансгенни мишки и тези системи са по-широко използвани от моделите с трансгенни плъхове. Ако плъховете са явно по-подходящ модел от мишките (например при проучване на механизма на карциногенезата за тумор, наблюдаван само при плъхове с оглед съпоставяне с изследване за токсичност при плъхове, или ако е известно, че метаболизмът при плъховете е по-представителен за човешкия метаболизъм) трябва да бъде взето под внимание използването на модели с трансгенни плъхове.

*Условия на отглеждане и хранене*

17. Температурата в експерименталното помещение с животните трябва в идеалния случай да бъде 22 °C ( $\pm 3$  °C). Въпреки че относителната влажност следва да бъде най-малко 30 % и е препоръчително тя да не надвишава 70 %, освен по време на почистване на стаята, целта е относителната влажност да се поддържа в интервала 50—60 %. Осветлението трябва да бъде изкуствено, като дневната последователност е 12 часа светлина, следвани от 12 часа тъмнина. За храненето могат да се използват обичайните лабораторни хранителни режими с неограничен достъп до вода за пиене. Изборът на хранителен режим може да бъде повлиян от нуждата да се осигури подходящо смесване с изпитван химикал, когато прилагането му е по този път. Животните трябва да бъдат разпределени в малки групи (не повече от пет) от един и същ пол, ако не се очаква агресивно поведение. Животните могат да се настаняват отделно, ако това е научно обосновано.

*Подготовка на опитните животни*

18. Здрави, млади, полово зрели животни в зряла възраст (на възраст от 8—12 седмици в началото на третирането) се разпределят на случаен принцип в контролни групи и третиранни групи. На животните се дава уникална идентификация. Животните се аклиматизират към лабораторните условия поне пет дни. Клетките трябва да бъдат подредени по такъв начин, че възможните ефекти в резултат на местоположението на клетката да бъдат сведени до минимум. В началото на изследването вариациите в телното на животните следва да са минимални и да не превишават  $\pm 20$  % от средното телно на всеки пол.

*Подготовка на дозите*

19. Твърдите изпитвани химикали следва да се разтворят или суспендират в подходящи разтворители или носители, или да се смесят в хранителния режим или в питейната вода преди дозирането на животните. Течните изпитвани химикали могат да се дозират директно или да се разреждат преди дозиране. При експозиция чрез инхалация изпитваните химикали могат да се прилагат като газ, пари или аерозол с твърда/течна фаза, в зависимост от техните физични и химични свойства. Следва да се използват пресни смеси на изпитвания химикал, освен ако данните за стабилността показват, че е допустимо съхранение.

**Условия на изпитване***Разтворител/носител*

20. Разтворителят/носителят не следва да има токсични ефекти при използваните обеми на доза, а също така не следва да има съмнения за химическа реакция между него и изпитвания химикал. Ако се използват други освен добре познатите разтворители/носители, включването им следва да се подкрепи от референтни данни за съвместимостта им. Препоръчва се, винаги когато е възможно, първо да се разглежда възможността за прилагането на вода като разтворител/носител.

*Положителни контроли*

21. Обикновено следва да се използват паралелни положителни контроли с животни. Въпреки това за лаборатории, които са доказали пригодността си (вж. параграф 23) и редовно използват тези изследвания, във всяко изследване може да бъде включена ДНК от предходни третиранни като положителни контроли животни за потвърждаване на успешността на метода. Такава ДНК от предходни опити следва да е получена от същите животински видове и представляващи интерес тъкани, и да е съхранявана по подходящ начин (вж. параграф 36). Когато се използват паралелни положителни контроли, не е необходимо прилагането при тях да е по същия път като изпитвания химикал; въпреки това, за положителните контроли следва да е известно, че предизвикват мутации в една или повече тъкани, представляващи интерес във връзка с изпитвания химикал. Дозите на химикали за положителните контроли следва да бъдат подбрани така, че да се получат слаби или умерени ефекти, въз основа на които да може да се извърши критична оценка на параметрите и на чувствителността на изследването. Примери за химикали за положителни контроли и някои от техните прицелни тъкани са включени в таблица 1.

Таблица 1

**Примери за химикали за положителни контроли и някои от техните прицелни тъкани**

| Химикал за положителна контрола и CAS №  | Наименование по EINECS и EINECS №   | Характеристики           | Прицелна тъкан за мутация |                                                                                                                                            |
|------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                          |                                     |                          | Плъхове                   | Мишки                                                                                                                                      |
| N-етил-N-нитрозоуреа<br>[CAS № 759-73-9] | N-етил-N-нитрозоуреа<br>[212-072-2] | Мутаген с пряко действие | Черен дроб, бял дроб      | Костен мозък, колон, епител на колона, черва, черен дроб, бял дроб, далак, бъбреци, гранулозни клетки от яйчниците, мъжки зародишни клетки |

| Химикал за положителна контрола и CAS №   | Наименование по EINECS и EINECS №                | Характеристики                                                               | Прицелна тъкан за мутация |                                                                                                             |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                           |                                                  |                                                                              | Плъхове                   | Мишки                                                                                                       |
| Етилкарбамат (уретан)<br>[CAS № 51-79-6]  | Уретан<br>[200-123-1]                            | Мутаген, изисква метаболизъм, но произвежда само слаби ефекти                |                           | Костен мозък, предстомах, тънко черво, черен дроб, бял дроб, далак                                          |
| 2,4-диаминотолуен<br>(CAS № 95-80-7)      | 4-метил- <i>m</i> -фенилен-диамин<br>[202-453-1] | Мутаген, изисква метаболизъм, също така положителен в <i>Spi</i> -изследване | Черен дроб                | Черен дроб                                                                                                  |
| Бензо[ <i>a</i> ]пирен<br>(CAS № 50-32-8) | бензо[ <i>def</i> ]хризен<br>[200-028-5]         | Мутаген, изисква метаболизъм                                                 | Черен дроб, була,         | Костен мозък, гърди, колон, предстомах, жлезист стомах, сърце, черен дроб, бял дроб, мъжки зародишни клетки |

#### Отрицателни контроли

22. Отрицателни контроли, третираните само с разтворител или носител, и в друго отношение третираните по същия начин като третираните групи, следва да се включат за всеки момент на пробовземане. При липсата на предходни или публикувани данни за контроли, показващи, че избраният разтворител/носител не предизвиква никакви неблагоприятни или мутагенни ефекти, за всеки момент на пробовземане следва да бъдат включени и нетретираните контроли, за да се установи допустимостта на контролата на носител.

#### Проверка на пригодността на лабораторията

23. Пригодността за тези изследвания следва да бъде установена чрез доказване на способността за възпроизвеждане на очаквани резултати от публикувани данни (24) за: 1) честоти на мутантите с химикали за положителни контроли (включително слабите отговори), като например посочените в таблица 1, химикали без мутагенно действие и контроли на носител; и 2) отделяне на трансген от геномна ДНК (например ефикасност на опаковането).

#### Определяне на първичната структура при мутанти

24. За нормативни цели не се изисква определяне на първичната структура на ДНК на мутанти, в частност когато е получен ясен положителен или отрицателен резултат. Независимо от това данните от определянето на първичната структура могат да бъдат от полза, когато се наблюдават големи колебания между отделните индивиди. В тези случаи определянето на първичната структура може да се използва, за да се изключи възможността за множество мутанти от една мутация или за клониране чрез определяне на дела на уникални мутанти от дадена тъкан. Определяне на първичната структура на приблизително 10 мутанта от тъкан и от животно следва да бъде достатъчно за лесно определяне дали в честотата на мутантите няма включени клонирани мутанти; Определяне на първичната структура на 25 мутанта може да бъде необходимо, за да се коригира математически честотата на мутантите за клоналност. Определяне на първичната структура на мутанти също може да бъде взето под внимание при откриване на неголеми увеличения на честотата на мутантите (т.е. непосредствено над стойностите за нетретираните контроли). Различията в мутационния спектър между колонии от мутанти от третираните и от нетретираните животни могат да подкрепят мутагенен ефект (29). Също така, мутационните спектри могат да бъдат полезни за разработването на механистични хипотези. Когато определянето на първичната структура трябва да бъде включено като част от протокола от изследването, при планирането на такива изследвания следва да се обърне специално внимание, по-специално по отношение на броя на мутантите с определена първична структура в проба, за да се постигне достатъчна статистическа мощност в съответствие с използвания статистически модел (вж. параграф 43).

#### ПРОЦЕДУРА

##### Брой и пол на животните

25. Броят животни в група следва да бъде предварително определен така, че да е достатъчен, за да осигури статистическата мощност, необходима за откриване най-малко на удвояване на честотата на мутантите. Групите са с размер най-малко пет животни; независимо от това, ако статистическата мощност е недостатъчна, броят животни трябва да се увеличи, както се изисква. Обикновено следва да се използват мъжки животни. Може да има случаи, когато би било обосновано изпитването само на женски животни; например, при изпитване на лекарства, специфични за жени, или когато се изследва метаболизъм, специфичен за женския пол. Ако съществуват значителни различия между половете по отношение на токсичността или на метаболизма, тогава се изисква използване и на мъжки, и на женски екземпляри.

**Период на прилагане**

26. Въз основа на наблюдения, че мутациите се натрупват с всяко третиране, е необходима схема с повтаряща се доза, с ежедневно третиране в продължение на 28 дни. Това по принцип се счита за приемливо както за генериране на достатъчно натрупване на мутации от слаби мутагени, така и за предоставяне на времето на експозиция, подходящо за откриване на мутации в бавно пролифериращи органи. За някои оценки могат да бъдат подходящи алтернативни схеми на третиране, и тези алтернативни графици на дозиране следва да бъдат научно обосновани в протокола. Периодите на третиране не трябва да бъдат по-кратки от времето, необходимо за пълното индуциране на всички относими метаболизиращи ензими, и по-кратки третирания могат да доведат до необходимост от използване на множество моменти на пробовземане, които са подходящи за органи с различни степени на пролиферация. Във всички случаи при обосновката на даден протокол следва да се използва цялата налична информация (например за обща токсичност или метаболизъм и фармакокинетика), особено при отклонение от горните стандартни препоръки. По-дълги от 8 седмици периоди на третиране, въпреки че могат да доведат до увеличаване на чувствителността, следва да бъдат ясно обяснени и обосновани, тъй като дългите периоди на третиране могат да доведат до видимо увеличение на честотата на мутантите чрез клонална експанзия (29).

**Нива на доза**

27. Нивата на доза следва да се основават на резултатите от изследване за определяне на обхвата на дозите, измерващо общата токсичност, проведено с използване на същия път на експозиция, или на резултатите от предходни изследвания за субакутна токсичност. Нетрансгенните животни от същата порода гризачи могат да се използват за определяне на обхвата на дозите. С цел получаване на информация за зависимостта доза-отговор, основното изпитване следва да включва отрицателна контролна група (вж. параграф 22) и най-малко три, разположени на подходящи интервали, нива на доза, с изключение на случаите, когато е използвана пределната доза (вж. параграф 28). Най-високата доза следва да е максималната допустима доза (МДЦ). Най-високата доза се определя като доза, генерираща признаци на такава токсичност, че би могло да се очаква по-високи нива на доза при същия график на дозиране да доведат до леталност. Химикали със специфична биологична активност при ниски, нетоксични дози (като хормони и митогени) и химикали, които показват насищане по отношение на токсикокинетични свойства, могат да бъдат изключения от критериите за определяне на дозата и следва да се оценяват за всеки конкретен случай. Нивата на доза следва да обхващат от максимална до слаба токсичност или липса на токсичност.

**Изпитване при пределна концентрация**

28. Ако опити за определяне на обхвата на дозите, или съществуващи данни от свързани породи гризачи, показват че режим на третиране най-малко при пределна концентрация (вж. по-долу) не дава забележими токсични ефекти, а генотоксичност не би могла да се очаква на базата на данни от структурно свързани химикали, то тогава пълно изследване с три нива на доза може да не се смята за необходимо. За период на прилагане от 28 дни (т.е. 28 ежедневни третирания) пределната доза е 1 000 mg/kg телесно тегло/ден. За периоди на прилагане от 14 дни или по-кратки пределната доза е 2 000 mg/kg телесно тегло/ден (графици на дозиране, различни от 28 ежедневни третирания, следва да бъдат научно обосновани в протокола; вж. параграф 26).

**Прилагане на дозите**

29. Изпитваният химикал обикновено се прилага със сонда, като се използва стомашна тръба или подходяща интубационна канюла. Като цяло, при планирането на изследването следва да бъде взет предвид очакваният път на експозиция на човека. Следователно други пътища на експозиция (като например чрез питейна вода, подкожно, интравенозно, локално, чрез вдишване, интратрахеално, чрез хранителен режим или чрез имплантация) могат да бъдат приемливи, ако могат да бъдат обосновани. Интраперитонеалното инжектиране не се препоръчва, тъй като то не е физиологично относим път на експозиция на човека. Максималният обем течност, който може да се приложи еднократно със сонда или инжекция, зависи от големината на изпитваното животно. Обемът не трябва да надвишава 2 ml/100 g телесно тегло. Обеми, по-високи от този, следва да се обосноват. С изключение на дразнещи или корозивни химикали, при които обикновено се проявяват изострени ефекти при по-високи концентрации, варирането в изпитвания обем трябва да бъде сведено до минимум чрез регулиране на концентрацията с оглед осигуряване на постоянен обем при всички нива на доза.

**Момент на пробовземане***Соматични клетки*

30. Моментът на пробовземане е критична променлива, защото се определя от периода, който е необходим за фиксирането на мутациите. Този период е специфичен за дадена тъкан и изглежда е свързан с времето за обновяване на популацията от клетки, като отговорът при костния мозък и червата е бърз, докато отговорът при черния дроб е

много по-бавен. Подходящ компромис за измерване на честотите на мутантите както в бързо, така и в бавно пролифериращите тъкани, е 28 последователни ежедневни третираня (както е посочено в параграф 26) и пробовземане три дни след последното третиране; максималната честота на мутантите може обаче да не се прояви в бавно пролифериращите тъкани при тези условия. Ако бавно пролифериращите тъкани са от особено значение, тогава може да бъде по-подходящ по-късен момент на пробовземане — 28 дни след 28-дневния период на прилагане (16)(29). В такива случаи, вторият момент на пробовземане заменя момента на пробовземане след 3 дни, и изисква научна обосновка.

#### *Зародишни клетки*

31. Изследванията с TGR са подходящи за изследване на индуцирането на генна мутация в мъжки зародишни клетки (7)(8)(27), за което графикът и кинетиката на сперматогенезата са добре установени (27). Малкият брой яйцеклетки, налични за анализ, дори след свръховулация, както и фактът, че няма синтез на ДНК в овоцити, изключва възможността за определяне на мутации в женските зародишни клетки чрез използване на трансгенни изследвания (31).
32. Моментите на пробовземане за мъжки зародишни клетки следва да се избера така, че да бъдат взети проби в обхвата на експонираните видове клетки по време на развитието на зародишните клетки, и така, че прицелният за пробовземането етап да е получил достатъчна експозиция. Времето за нарастване на развиващите се зародишни клетки от сперматогониални стволови клетки до зрели сперматозоиди, достигнали семепровода/опашката на епидидима, е ~ 49 дни при мишки (36) и ~ 70 дни при плъхове (34)(35). След 28-дневна експозиция с последващи три дни преди момента на пробовземане акумулираните сперматозоиди, събрани от семепровода/опашката на епидидима (7)(8), представляват клетъчна популация, експонирана приблизително по време на втората половина на сперматогенезата, което включва и мейотичния, и постмейотичния период, но не сперматогониалния период или периода на стволовите клетки. С цел адекватно пробовземане на клетки в семепровода/опашката на епидидима, които са били сперматогониални стволови клетки по време на периода на експозиция, се изисква допълнителен момент на пробовземане най-малко 7 седмици (мишки) или 10 седмици (плъхове) след прекратяване на третирането.
33. Клетките, получени от семенните каналчета след режима от 28 + 3 дни, изграждат смесена популация, обогатена за всички етапи на развиващите се зародишни клетки (7)(8). Пробовземането на тези клетки за откриването на генна мутация не предоставя оценка на етапите, на които се индуцират мутации в зародишните клетки, която да е толкова точна, колкото тази, която може да се получи при пробовземане на сперматозоиди от семепровода/опашката на епидидима (тъй като от каналчетата се пробовземат редица типове зародишни клетки и има известни количества соматични клетки, замърсяващи тази клетъчна популация). Независимо от това вземането на проби от клетки от семенните каналчета в допълнение към сперматозоидите от семепровода/опашката на епидидима след режим за пробовземане от само 28 + 3 дни ще обхване в известна степен клетки, експонирани през по-голямата част от етапите на развитие на зародишните клетки, и може да бъде полезно за откриване на някои мутагени в зародишни клетки.

#### **Наблюдения**

34. Общи клинични наблюдения следва да бъдат извършвани поне един път дневно, за предпочитане по едно и също време всеки ден и като се има предвид пиковият период за поява на очакваните ефекти след дозиране. Здравословното състояние на животните следва да се записва. Поне два пъти дневно всички животни следва да се наблюдават за заболяемост и смъртност. Теглото на всички животни следва да се измерва поне един път в седмицата и при умъртвяването. Консумацията на храна се измерва най-малко един път седмично. Ако изпитваният химикал се прилага чрез водата за пиене, консумацията на вода следва да се измерва при всяка смяна на водата и най-малко един път в седмицата. Животни, проявяващи нелетални признаци на прекалена токсичност, следва да се умъртвят преди приключването на периода на изпитване (23).

#### **Събиране на тъкани**

35. Обосновката за събиране на тъкани следва да бъде ясно определена. Тъй като е възможно индуцирането на мутации да бъде изследвано в почти всяка тъкан, изборът на тъкани, които трябва да бъдат събрани, следва да се основава на причината за провеждането на изследването и на всички съществуващи данни за мутагенност, канцерогенност или токсичност на проучвания химикал. Важни фактори за разглеждане следва да включват пътя на прилагане (въз основа на вероятния път или пътища на експозиция на човека), прогнозираното разпределение в тъканите, както и възможния механизъм на действие. При липсата на каквато и да било съпътстваща информация следва да бъдат събрани няколко соматични тъкани, които могат да представляват интерес. Те следва да представляват бързо пролифериращите, бавно пролифериращите тъкани и тъканите от местата на контакт. В допълнение, сперматозоидите от семепровода/опашката на епидидима и развиващите се зародишни клетки от семенните каналчета (както е описано в параграфи 32 и 33) следва да се събират и съхраняват в случай че се изисква бъдещ анализ за мутагенност за зародишни клетки. Теглото на органите следва да бъде измерено, като за по-големите органи от всички животни следва да бъде взета една и съща площ.

**Съхранение на тъкани и ДНК**

36. Тъканите (или тъканните хомогенати) следва да се съхраняват при температура – 70 °C или по-ниска, и да се използват за изолиране на ДНК в рамките на 5 години. Изолираната ДНК, съхранявана в охладено състояние при 4 °C в подходящ буфер, следва да се използва оптимално за анализ на мутации в рамките на 1 година.

**Селекция на тъкани за анализ на мутанти**

37. Изборът на тъкани трябва да бъде основан на съображения като: 1) пътя на прилагане или мястото на първия контакт (напр. жлезист стомах при прилагане по орален път, бял дроб при прилагане чрез инхалация, или кожа при локално прилагане); и 2) наблюдаваните фармакокинетични параметри в изследвания за обща токсичност, които показват свързаното с тъканта елиминиране, задържане или натрупване, или прицелните органи за токсичността. Ако са извършени последващи изследвания за канцерогенност, трябва да бъдат взети под внимание прицелните тъкани за канцерогенност. Изборът на тъкани за анализ следва да увеличи до максимум откриването на химикали, които са мутагени с пряко действие *in vitro*, бързо метаболизиран, имат висока реактивоспособност или се абсорбират слабо, или онези, за които прицелната тъкан се определя от пътя на прилагане (6).
38. При липсата на съпътстваща информация и като се вземе предвид мястото на контакт, дължащо се на пътя на прилагане, черният дроб и още поне една тъкан с висока скорост на протичане на деленето (напр. жлезист стомах, костен мозък) следва да бъдат оценени за мутагенност. В повечето случаи горепосочените изисквания могат да се постигнат от анализи на две внимателно подбрани тъкани, но в някои случаи ще са необходими три или повече. Ако има причини за конкретна загриженост относно ефектите върху зародишните клетки, включително положителни отговори при соматични клетки, следва тъкани от зародишни клетки да бъдат оценени за мутации.

**Методи за измерване**

39. Стандартни лабораторни или публикувани методи за откриване на мутанти са на разположение за препоръчаните трансгенни модели: ламбда бактериофаги и плаزمиди, носещи *lacZ* (30); мишки, носещи *lacI* (2)(18); мишки, носещи *gpt delta* (22); плъхове, носещи *gpt delta* (28); *cII* (17). Измененията следва да бъдат обосновани и надлежно документирани. Данните от множество опаковки могат да бъдат обобщени и използвани за постигане на достатъчен брой плаки или колонии. Независимо от това, необходимостта от голям брой реакции по опаковане за постигане на достатъчен брой плаки може да е показател за наличието на ниско качество на ДНК. В такива случаи към данните трябва да се подхожда предпазливо, тъй като те могат да са ненадеждни. Оптималният общ брой плаки или колонии от проба ДНК се регулира от статистическата вероятност за откриване на достатъчен брой мутанти при дадена честота на мутанти при спонтанна мутация. Като цяло се изискват най-малко 125 000 до 300 000 плаки, ако честотата на мутанти при спонтанна мутация е от порядъка на  $3 \times 10^{-5}$  (15). За изследването с Big Blue®, носещи *lacI*, е важно да се докаже, че целият набор от фенотипове на мутанти с определен цвят може да бъде открит посредством включването на подходящи контроли с определен цвят паралелно с всяко поставяне в гнезда. Тъканите и получените проби (единици) следва да бъдат обработени и анализирани с използването на блокова схема, в която елементите от контролната група на разтворител/носител, положителната контролна група (ако се използва) или положителната контролна ДНК (където е уместно) и всяка една от третираните групи се обработват заедно.

**ДАННИ И ДОКЛАДВАНЕ****Обработка на резултатите**

40. Индивидуалните данни за животните следва да се представят в таблица. Опитната единица е животното. Докладът следва да включва общия брой образуващи плака единици (rfu) или образуващи колония единици (cfu), броя на мутантите, и честотата на мутантите за всяка тъкан от всяко животно. Ако има множество реакции на опаковане/изолиране, следва да се докладва броят на реакциите на проба от ДНК. Макар че данните за всяка отделна реакция трябва да бъдат съхранени, само общите rfu или cfu трябва да бъдат докладвани. Трябва да бъдат докладвани данните за токсичност и клиничните признаци, както е посочено в параграф 34. Трябва да бъдат представени всички резултати от определянето на първичната структура за всеки анализиран мутант, и да бъдат посочени изчисленията на честотата на мутация в резултат от тях за всяко животно и тъкан.

**Статистическа оценка и тълкуване на резултатите**

41. Има няколко критерия за определяне на положителен резултат, като например свързано с дозата увеличение на честотата на мутантите или явно увеличение на честотата на мутантите в група с еднократна доза в сравнение с контролната група на разтворител/носител. Най-малко три третиранни с определена доза групи трябва да бъдат анализирани, за да бъдат получени достатъчно данни за анализ доза-отговор. Независимо от това, че първостепенното съображение следва да е биологичната относимост, могат да се използват подходящи статистически методи като помощно средство за оценката на резултатите от изпитването (4)(14)(15)(25)(26). При използваните статистически изпитвания за опитна единица следва да се счита животното.

42. Изпитван химикал, за който резултатите не удовлетворяват горните критерии, се смята за немутагенен в настоящото изследване. За биологичната относимост на даден отрицателен резултат следва да бъде потвърдена експозицията на тъканта.
43. За подпомагане при тълкуването на резултатите от анализите за определяне на първичната структура на ДНК на разположение са редица статистически подходи (1)(5)(9)(19).
44. Проучването дали наблюдаваните стойности са в рамките на контролния обхват от предходни изследвания, или извън него, може да осигури насоки при оценката на биологичната значимост на отговора (32).

#### **Доклад от изпитването**

45. Докладът от изпитването следва да включва следната информация:

##### *Изпитван химикал:*

- данни за идентификация и CAS №, ако са известни;
- източник, номер на партидата, при наличност;
- физическа природа и чистота;
- физични и химични свойства, относими към провеждането на изследването;
- стабилност на изпитвания химикал, ако е известна;

##### *Разтворител/носител:*

- обосновка за избора на носител;
- разтворимост и стабилност на изпитвания химикал в разтворител/носител, ако са известни;
- изготвяне на рецептурите за хранителен режим, питейна вода или инхалация;
- аналитични определяния, свързани с рецептурите (напр. устойчивост, хомогенност, номинални концентрации);

##### *Изпитвани животни:*

- използван вид/порода и обосновка за избора;
- брой, възраст и пол на животните;
- източник, условия на отглеждане, хранителен режим и т.н.;
- индивидуално тегло на животните в началото на изпитването, в т.ч. обхват на телесното тегло, средни стойности и стандартно отклонение за всяка група;

##### *Условия на изпитване:*

- положителни и отрицателни (носител/разтворител) контролни данни;
- данни от изследването за установяване на обхвата;
- обосновка за избора на нивото на доза;
- подробности за приготвянето на изпитвания химикал;
- подробна информация относно прилагането на изпитвания химикал;
- обосновка на пътя на прилагане;
- методи за измерване на токсичността за животните, включително, когато е необходимо, хистопатологични или хематологични анализи и честота, с която са правени наблюдения върху животните или е измервано телесното тегло;
- методи за проверка дали изпитваният химикал е достигнал до прицелната тъкан, или до общото кръвообращение, ако са получени отрицателни резултати;
- действителна доза (mg/kg телесно тегло дневно), изчислена от концентрацията на изпитвания химикал в хранителния режим/питейната вода (ppm), и консумация, ако е приложимо;
- подробности относно качество на храната и водата;
- подробно описание на графици на третиране и вземане на проби и обосновки за направения избор;

- метод за умъртвяване;
- процедури за изолиране и съхраняване на тъкани;
- методи за изолиране на геномна ДНК на гризачи, отделяне на трансгена от геномната ДНК и включване на трансгенна ДНК в бактерия гостоприемник;
- източник и номера на партии за всички клетки, комплекти и реагенти (когато е приложимо);
- методи за изброяване на мутантите;
- методи за молекулярен анализ на мутанти и използване при корекция за клоналност и/или изчисляване на честоти на мутация, ако е приложимо;

#### Резултати:

- състояние на животните преди и през целия период на изпитване, включително признаци на токсичност;
- телесно тегло и тегло на органи при умъртвяването;
- за всяка тъкан/животно — брой на мутантите, брой на оценените плаки или колонии, честота на мутантите;
- за всяка тъкан/група животни — брой на реакциите на опаковане на проба от ДНК, общ брой на мутантите, средна честота на мутантите, стандартно отклонение;
- взаимоотношение доза-отговор, където е възможно;
- за всяка тъкан/животно — брой на независимите мутанти и средна честота на мутация, където е бил извършен молекулярен анализ;
- паралелни отрицателни контролни данни и отрицателни контролни данни от предишни изследвания, с обхвати, средни стойности и стандартни отклонения;
- паралелни положителни контролни данни (или ДНК от предходно третирани като положителни контроли животни);
- аналитични определения, ако има такива (например концентрации на ДНК, използвани при пакетирание, данни за определяне на първичната структура на ДНК);
- статистически анализи и използвани методи;

#### Обсъждане на резултатите

#### Заклучение

#### ЛИТЕРАТУРА

- (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  $\lambda$  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<sup>-</sup> — 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<sup>-</sup> Selection: an Efficient Method to Detect  $\gamma$ -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, № 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, № 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  $\lambda$  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, № 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.
-

## Допълнение

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

**Период на прилагане:** общият период, в продължение на който е дозирано дадено животно.

**Заместване на двойка бази:** тип мутация, която води до заместване на една отделна нуклеотидна база от ДНК с друга нуклеотидна база от ДНК.

**Капсид:** белтъчната обвивка, в която е обвита вирусна частица.

**Химикал:** вещество или смес.

**Клонална експанзия:** производството на много клетки от една отделна клетка (мутант).

**Образуваща колония единица (cfu):** измерителна единица за броя жизнеспособни бактерии.

**Конкатемер:** дълга непрекъсната биомолекула, образувана чрез конкатенация на множество идентични копия.

**Cos-място:** Състоящ се от 12 нуклеотида сегмент от едноверижна ДНК, разположен в двата края на двуверижния геном на бактериофаг ламбда.

**Делеция:** мутация, при която геномът изгубва един или повече (последователни) нуклеотиди.

**Електропорация:** прилагането на електрически импулси за увеличаване на пропускливостта на клетъчната мембрана.

**Собствен ген:** ген, който е присъщ на генома.

**Свърхдисперсия:** вариране в повтарящите се очаквания за част от популация, което е по-голямо, отколкото очакваното за популация с биомно разпределение.

**Мутация с изместване на рамката на разчитане:** генна мутация в рамките на кодираща протеин/пептид ДНК последователност, причинена от инсерции или делеции на брой нуклеотиди, който не е делим без остатък на три.

**Инсерция:** добавянето на една или повече нуклеотидни двойки бази в ДНК последователност.

**Множество мутанти от една мутация (jackpot):** голям брой мутанти, които са възникнали чрез клонална експанзия от една мутация.

**Големи делеции:** делеции в ДНК на повече от няколко килобази (които се откриват ефективно с изследвания със селекция на *Spi*<sup>-</sup> и с плазмиди, съдържащи *lacZ*).

**Лигиране:** ковалентно свързване на два края на ДНК молекула с използване на ДНК-лигаза.

**Митоген:** химикал, който стимулира клетка за започване на клетъчното делене чрез задействане на митозата (т.е. клетъчното делене).

**Неутрален ген:** ген, който не е повлиян от положителен или отрицателен селекционен натиск.

**Опаковане:** синтез на инфекциозни фагови частици от смес от фагов капсид, протеини от опашката и конкатемер на фагови ДНК молекули. Обикновено се използва за опаковане на клонирана ДНК в ламбда вектор (отделена с *cos*-места) в инфекциозни ламбда частици.

**Ефикасност на опаковането:** ефикасността, с която опакованите бактериофаги се изолират в бактерията гостоприемник.

**Образуваща плака единица (pfu):** измерителна единица за броя жизнеспособни бактериофаги.

**Точкова мутация:** общ термин за мутация, която засяга само малка ДНК последователност, включително малки инсерции, делеции и замествания на двойка бази.

**Положителна селекция:** метод, който позволява да оцелеят само мутантите.

**Репортерен ген:** ген, чийто продукт (ген с мутация) се открива лесно.

**Момент на пробовземане:** край на периода от време, предхождащ умъртвяването, през който химикалът не се прилага, и по време на който нерепарираните повреди в ДНК се фиксират в стабилни мутации.

**Вектор совалка:** вектор, устроен по такъв начин, че да може да се разпространява в два гостоприемника от различен вид; съответно, включена във вектор совалка ДНК може да бъде изпитвана или манипулирана в два различни типа клетки или в два различни организма.

**Изпитван химикал:** Всяко вещество или смес, изпитвано(а) чрез използването на настоящия метод за изпитване.

**Трансгенен:** който произхожда от, или е свързан с, или представлява организъм, чийто геном е бил изменен чрез пренос на ген или гени от друг вид.“

---