

II

(Μη νομοθετικές πράξεις)

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 900/2014 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 15ης Ιουλίου 2014

για την τροποποίηση, με σκοπό την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο, του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ,

Έχοντας υπόψη τη Συνθήκη για τη λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης,

Έχοντας υπόψη τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 18ης Δεκεμβρίου 2006, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) και για την ίδρυση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Χημικών Προϊόντων καθώς και για την τροποποίηση της οδηγίας 1999/45/ΕΚ και για την κατάργηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 793/93 του Συμβουλίου και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1488/94 της Επιτροπής καθώς και της οδηγίας 76/769/ΕΟΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών της Επιτροπής 91/155/ΕΟΚ, 93/67/ΕΟΚ, 93/105/ΕΚ και 2000/21/ΕΚ ⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 13 παράγραφος 2,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής ⁽²⁾ περιέχει τις μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας χημικών ουσιών, οι οποίες πρέπει να εφαρμόζονται για τους σκοπούς του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006.
- (2) Είναι αναγκαίο να επικαιροποιηθεί ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 προκειμένου να συμπεριληφθούν κατά προτεραιότητα νέες και επικαιροποιημένες μέθοδοι δοκιμών, οι οποίες εγκρίθηκαν πρόσφατα από τον ΟΟΣΑ, με σκοπό να ληφθεί υπόψη η τεχνική πρόοδος και να επιτευχθεί μείωση του αριθμού των ζώων που χρησιμοποιούνται σε πειράματα, σύμφωνα με την οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου ⁽³⁾. Ζητήθηκε η γνώμη των ενδιαφερομένων φορέων σχετικά με το παρόν σχέδιο.
- (3) Η παρούσα προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο περιλαμβάνει έξι νέες μεθόδους δοκιμών για τον προσδιορισμό της τοξικότητας και άλλων επιδράσεων στην υγεία, μεταξύ των οποίων μία μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, μία διευρυμένη μελέτη αναπαραγωγικής τοξικότητας μιας γενεάς, μία μέθοδο in vivo προσδιορισμού γονιδιακής μετάλλαξης σε διαγονιδιακά τρωκτικά, μία δοκιμή in vitro για την εκτίμηση των επιδράσεων στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών, καθώς και δύο μεθόδους in vivo για την εκτίμηση των οιστρογονικών και (αντι)ανδρογονικών επιδράσεων.
- (4) Συνεπώς, ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 θα πρέπει να τροποποιηθεί αναλόγως.
- (5) Τα μέτρα που προβλέπονται στον παρόντα κανονισμό είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής που έχει συσταθεί βάσει του άρθρου 133 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006,

⁽¹⁾ ΕΕ L 396 της 30.12.2006, σ. 1.

⁽²⁾ Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 440/2008 της Επιτροπής, της 30ής Μαΐου 2008, για καθορισμό των μεθόδων δοκιμής κατ' εφαρμογή του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1907/2006 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, για την καταχώριση, την αξιολόγηση, την αδειοδότηση και τους περιορισμούς των χημικών προϊόντων (REACH) (ΕΕ L 142 της 31.5.2008, σ. 1).

⁽³⁾ Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΟΝ ΠΑΡΟΝΤΑ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται σύμφωνα με το παράρτημα του παρόντος κανονισμού.

Άρθρο 2

Ο παρών κανονισμός αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή του στην *Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης*.

Ο παρών κανονισμός είναι δεσμευτικός ως προς όλα τα μέρη του και ισχύει άμεσα σε κάθε κράτος μέλος.

Βρυξέλλες, 15 Ιουλίου 2014.

Για την Επιτροπή
Ο Πρόεδρος
José Manuel BARROSO

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Το παράρτημα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 440/2008 τροποποιείται ως εξής:

Παρεμβάλλονται τα κεφάλαια Β.53, Β.54, Β.55, Β.56, Β.57 και Β.58:

«Β.53. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΝΕΥΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 426 (2007). Τον Ιούνιο του 1995 στην Κοπεγχάγη, η ομάδα εργασίας του ΟΟΣΑ για την τοξικότητα στην αναπαραγωγή και την αναπτυξιακή τοξικότητα συζήτησε την αναγκαιότητα επικαιροποίησης των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών για την τοξικότητα στην αναπαραγωγή και την αναπτυξιακή τοξικότητα, καθώς και την κατάρτιση νέων κατευθυντήριων γραμμών για τελικά σημεία που δεν είχαν ακόμα καλυφθεί (1). Η ομάδα εργασίας εισηγήθηκε τη σύνταξη κατευθυντήριας γραμμής για τη διεξαγωγή δοκιμών για την αναπτυξιακή νευροτοξικότητα βάσει κατευθυντήριας γραμμής του Οργανισμού για την Προστασία του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA), η οποία έχει αναθεωρηθεί έκτοτε (2). Τον Ιούνιο του 1996 πραγματοποιήθηκε δεύτερη συνεδρίαση διαβούλευσης στην Κοπεγχάγη, για να δοθούν οδηγίες στη Γραμματεία σχετικά με τον σκελετό μιας νέας κατευθυντήριας γραμμής για τη διεξαγωγή δοκιμών για την αναπτυξιακή νευροτοξικότητα, συμπεριλαμβανομένων των κύριων στοιχείων της, όπως για παράδειγμα λεπτομέρειες σχετικά με την επιλογή των ζωικών ειδών, την περίοδο χορήγησης των δόσεων, την περίοδο δοκιμής, τα προς εκτίμηση τελικά σημεία και τα κριτήρια αξιολόγησης των αποτελεσμάτων. Το 1998 δημοσιεύθηκε κατευθυντήρια γραμμή των ΗΠΑ για την εκτίμηση των κινδύνων νευροτοξικότητας (3). Τον Οκτώβριο του 2000 πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά συνάντηση διαβούλευσης των εμπειρογνομόνων του ΟΟΣΑ και ημερίδα στο Ινστιτούτο Επιστημών του Κινδύνου του ILSI, ενώ το 2005 πραγματοποιήθηκε στο Τόκιο συνάντηση διαβούλευσης εμπειρογνομόνων. Σκοπός των συναντήσεων αυτών ήταν να συζητηθούν τα επιστημονικά και τεχνικά ζητήματα που αφορούν την υφιστάμενη κατευθυντήρια γραμμή για τη διεξαγωγή δοκιμών, ενώ οι συστάσεις που διατυπώθηκαν κατά τις συναντήσεις (4)(5)(6)(7) ελήφθησαν υπόψη στην ανάπτυξη της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Πρόσθετες πληροφορίες για τη διεξαγωγή, την ερμηνεία και την ορολογία που χρησιμοποιείται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρέχονται στα καθοδηγητικά έγγραφα αριθ. 43 “Μέθοδοι δοκιμών και εκτίμηση της τοξικότητας στην αναπαραγωγή” (8) και αριθ. 20 “Μέθοδοι δοκιμών νευροτοξικότητας” (9) του ΟΟΣΑ.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

2. Είναι γνωστό ότι ορισμένες χημικές ουσίες έχουν νευροτοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη του ανθρώπου και άλλων ειδών (10)(11)(12)(13). Ο προσδιορισμός της δυνατότητας μιας χημικής ουσίας να προκαλέσει αναπτυξιακή νευροτοξικότητα ενδέχεται να είναι αναγκαίος για την εκτίμηση και την αξιολόγηση των τοξικών χαρακτηριστικών αυτής. Οι μελέτες αναπτυξιακής νευροτοξικότητας έχουν σχεδιαστεί κατά τρόπο ώστε να παρέχουν δεδομένα, συμπεριλαμβανομένου του χαρακτηρισμού της σχέσης δόσης-απόκρισης, σχετικά με τις δυνητικές λειτουργικές και μορφολογικές επιδράσεις της ενδομήτριας έκθεσης και της έκθεσης κατά τα πρώτα στάδια της ζωής στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα των απογόνων.
3. Η μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας μπορεί να διεξαχθεί ως χωριστή μελέτη, να ενσωματωθεί σε μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή και/ή νευροτοξικότητας σε ενήλικες [π.χ. μέθοδοι δοκιμών Β.34 (14), Β.35 (15), Β.43 (16)] ή να προστεθεί σε μελέτη προγεννητικής αναπτυξιακής τοξικότητας [π.χ. μέθοδος δοκιμών Β.31 (17)]. Όταν η μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας ενσωματώνεται σε άλλη μελέτη ή συνδέεται με αυτήν, είναι επιτακτική ανάγκη να διατηρείται η αριστεία και των δύο τύπων μελέτης. Κάθε δοκιμή πρέπει να είναι σύμφωνη με τις ισχύουσες νομοθετικές διατάξεις ή κατευθυντήριες γραμμές κυβερνητικών ή θεσμικών οργάνων για τη χρήση πειραματόζωων στην έρευνα (π.χ. 18).
4. Πριν από τη διεξαγωγή της μελέτης, το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την ελεγχόμενη χημική ουσία, μεταξύ των οποίων η ταυτότητα και η χημική δομή της, οι φυσικές και χημικές ιδιότητές της, τα αποτελέσματα άλλων *in vitro* ή *in vivo* δοκιμών τοξικότητας της *en* λόγω χημικής ουσίας, τα τοξικολογικά δεδομένα που αφορούν ουσίες ανάλογης χημικής δομής, καθώς και τις προβλεπόμενες χρήσεις της ουσίας. Οι πληροφορίες αυτές είναι απαραίτητες για να διασφαλίζεται ότι η δοκιμή έχει ουσιαστική σημασία για την προστασία της υγείας του ανθρώπου και διευκολύνουν την επιλογή της κατάλληλης αρχικής δόσης χορήγησης.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

5. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται σε ζώα κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας. Υποβάλλονται σε δοκιμή οι μητέρες για την εκτίμηση των επιδράσεων σε κυοφορούντα και θηλάζοντα θηλυκά ζώα, ενώ είναι επίσης δυνατόν να προκύψουν και συγκριτικά στοιχεία (μητέρες έναντι απογόνων). Για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας, επιλέγονται τυχαία απόγονοι από την ίδια γέννα. Η αξιολόγηση συνίσταται σε παρατηρήσεις για τον εντοπισμό έντονων μακροσκοπικών νευρολογικών και συμπεριφορικών ανωμαλιών, συμπεριλαμβανομένων της αξιολόγησης της σωματικής ανάπτυξης, της οντογένεσης συμπεριφοράς, της κινητικής δραστηριότητας, της κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας, της μείωσης και της μνήμης, καθώς και αξιολόγηση του βάρους του εγκεφάλου και των νευροπαθολογικών ευρημάτων κατά τη μεταγεννητική ανάπτυξη και την ενήλικη ζωή.

6. Όταν η μέθοδος δοκιμών εφαρμόζεται ως χωριστή μελέτη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιπλέον διαθέσιμα ζώα σε κάθε ομάδα για συγκεκριμένες νευροσυμπεριφορικές, νευροπαθολογικές, νευροχημικές και ηλεκτροφυσιολογικές διαδικασίες, οι οποίες μπορούν να συμπληρώσουν τα δεδομένα που προκύπτουν από τις συνιστώμενες στην παρούσα μέθοδο δοκιμών εξετάσεις (16)(19)(20)(21). Οι συμπληρωματικές διαδικασίες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου οι εμπειρικές παρατηρήσεις, οι αναμενόμενες επιδράσεις ή ο μηχανισμός/τρόπος δράσης υποδηλώνουν συγκεκριμένο τύπο νευροτοξικότητας. Οι συμπληρωματικές αυτές διαδικασίες μπορούν να εφαρμοστούν τόσο στις μητέρες όσο και στα νεογνά. Επιπλέον, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν επίσης διαδικασίες *ex vivo* ή *in vitro*, εφόσον δεν θίγουν την αρτιότητα των διαδικασιών *in vivo*.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Επιλογή ζωικού είδους

7. Το προτιμώμενο είδος για τη δοκιμή είναι ο επίμυς (αρουραίος), αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα είδη, όταν είναι σκόπιμο. Σημειώνεται, ωστόσο, ότι οι ημέρες κυοφορίας και μεταγεννητικής περιόδου που προσδιορίζονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών αφορούν τα συνήθως χρησιμοποιούμενα στελέχη επιμύων και ότι, εάν χρησιμοποιηθεί διαφορετικό ζωικό είδος ή μη σύνθηδες στέλεχος, θα πρέπει να επιλεγούν συγκρίσιμες χρονικές περίοδοι. Η χρήση άλλου είδους θα πρέπει να αιτιολογείται βάσει τοξικολογικών, φαρμακοκινητικών και/ή άλλων δεδομένων. Η αιτιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη διαθεσιμότητα μεταγεννητικών νευροσυμπεριφορικών και νευροπαθολογικών εκτιμήσεων για το συγκεκριμένο είδος. Εάν έχει προηγηθεί δοκιμή που προκάλεσε ανησυχίες, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το είδος/στέλεχος που ήγειρε τις ανησυχίες. Λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών των διαφόρων στελεχών επιμύων όσον αφορά τις επιδόσεις, θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν επαρκή γονιμότητα και ανταπόκριση του στελέχους που επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί. Πρέπει να τεκμηριώνονται η αξιοπιστία και η ευαισθησία άλλων ειδών στον εντοπισμό της αναπτυξιακής νευροτοξικότητας.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

8. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζων θα πρέπει να είναι 22 ± 3 °C. Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις θα πρέπει να επιδιώκεται μια τιμή 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Είναι επίσης δυνατόν να αντιστραφεί ο κύκλος του φωτός πριν από το ζευγάρωμα και κατά τη διάρκεια της μελέτης, ώστε οι αξιολογήσεις των τελικών σημείων που σχετίζονται με τις λειτουργίες και τη συμπεριφορά να πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της περιόδου σκότους (υπό ερυθρό φως), δηλ. κατά τον χρόνο της φυσιολογικής δραστηριότητας των ζώων (22). Σε περίπτωση αλλαγής του κύκλου φωτός-σκότους πρέπει να προβλέπεται επαρκής χρόνος εγκλιματισμού, ώστε να μπορούν τα ζώα να προσαρμοστούν στον νέο κύκλο. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Πρέπει να αναφέρεται το είδος της τροφής και του νερού και να υποβάλλονται και τα δύο σε ανάλυση για προσμείξεις.
9. Τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς, σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου. Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κλωβούς κατάλληλους για τον σκοπό αυτό. Μόλις υπάρξουν ενδείξεις συνουσίας ή, το αργότερο, τη 15η ημέρα κύησης, τα ζευγαρωμένα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται χωριστά σε κλωβούς τοκετού. Η διάταξη των κλωβών θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλωβών. Στα ζευγαρωμένα θηλυκά ζώα θα πρέπει να παρέχονται κατάλληλα και καθορισμένα υλικά κατασκευής φωλιάς όταν πλησιάζει ο τοκετός. Είναι γνωστό ότι ο ακατάλληλος χειρισμός ή το άγχος κατά τη διάρκεια της κύησης μπορεί να έχει δυσμενή αποτελέσματα, μεταξύ των οποίων προγεννητική απώλεια της κύησης και αλλαγή της εμβρυϊκής και μεταγεννητικής ανάπτυξης. Για την αποφυγή της αποβολής εμβρύων εξαιτίας παραγόντων που δεν σχετίζονται με την αγωγή, θα πρέπει να εκτελούνται με προσοχή οι χειρισμοί των ζώων κατά την κυοφορία και να αποτρέπεται η πρόκληση άγχους από εξωτερικούς παράγοντες, όπως ο υπερβολικός εξωτερικός θόρυβος.

Προετοιμασία των ζώων

10. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή ζώα, εγκλιματισμένα στις εργαστηριακές συνθήκες, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί στο παρελθόν σε πειραματικές διαδικασίες, εκτός εάν η μελέτη έχει ενσωματωθεί σε άλλη μελέτη (βλ. παράγραφο 3). Τα ζώα της δοκιμής θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως προς το είδος, το στέλεχος, την προέλευση, το φύλο, το βάρος και την ηλικία. Κάθε ζώο θα πρέπει να λαμβάνει αποκλειστικό αναγνωριστικό αριθμό και να σημαίνεται με αυτόν. Τα ζώα όλων των ομάδων δοκιμής θα πρέπει, στο μέτρο του εφικτού, να έχουν παρόμοιο βάρος και ηλικία, εντός των φυσιολογικών ορίων του είδους και του στελέχους που αποτελούν το αντικείμενο της μελέτης. Σε κάθε επίπεδο δόσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται νεαρά ενήλικα άτοκα θηλυκά ζώα. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή ζευγαρώματος ζώων προερχόμενων από την ίδια γέννα. Η ημέρα κύησης (HK) 0 είναι η ημέρα κατά την οποία παρατηρούνται κολπικό βύσμα και/ή σπέρμα. Σε περίπτωση αγοράς ζώων με συγκεκριμένη ημερομηνία έναρξης κύησης από προμηθευτή, θα πρέπει να τους παρέχεται επαρκής χρόνος εγκλιματισμού (π.χ. 2-3 ημέρες). Τα ζευγαρωμένα θηλυκά ζώα θα πρέπει να τοποθετούνται στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής τυχαία και χωρίς ιδιαίτερες προτιμήσεις και, εφόσον είναι δυνατόν, να κατανέμονται ομοιογενώς μεταξύ των ομάδων (π.χ. συνιστάται στρωματοποιημένη διαδικασία τυχοποίησης για την εξασφάλιση ομοιογενούς κατανομής μεταξύ όλων των ομάδων, όπως η διαδικασία που βασίζεται στο σωματικό βάρος). Τα θηλυκά ζώα που έχουν γονιμοποιηθεί από το ίδιο αρσενικό θα πρέπει να κατανέμονται ισομερώς σε όλες τις ομάδες.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

11. Κάθε ομάδα δοκιμής και μαρτύρων θα πρέπει να περιέχει επαρκή αριθμό κυοφορούντων θηλυκών ζώων που θα εκτεθούν στην ελεγχόμενη χημική ουσία, ώστε να εξασφαλίζεται η γέννηση κατάλληλου αριθμού απογόνων για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Συνιστάται να χρησιμοποιούνται συνολικά 20 γέννες σε κάθε επίπεδο δόσης. Επιτρέπονται σχεδιασμοί που προβλέπουν ομάδες για επανάληψη χορήγησης ή κλιμακωτή χορήγηση των δόσεων, εάν επιτυγχάνονται οι συνολικοί αριθμοί γεννών ανά ομάδα και να χρησιμοποιούνται κατάλληλα στατιστικά μοντέλα για τη συνεκτίμηση των επαναλήψεων.
12. Κατά την 4η μεταγεννητική ημέρα (ΜΓΗ) ή πριν από αυτή (η ημέρα τοκετού είναι η ΜΓΗ 0), θα πρέπει να προσαρμόζεται το πλήθος νεογνών κάθε γέννας με την απομάκρυνση των πλεοναζόντων νεογνών μέσω τυχαίας επιλογής, ώστε όλες οι γέννες να έχουν ομοιόμορφο μέγεθος (23), το οποίο δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το μέσο μέγεθος γέννας στο χρησιμοποιούμενο στέλεχος τρωκτικών (8-12). Η γέννα θα πρέπει να περιλαμβάνει, στο μέτρο του δυνατού, ίσο αριθμό αρσενικών και θηλυκών νεογνών. Η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους, δεν είναι αποδεκτή. Μετά την τυποποίηση των γεννών (επιλογή ακατάλληλων ζώων) και πριν από τον έλεγχο των λειτουργικών τελικών σημείων, κάθε νεογνό που προορίζεται για δοκιμή πριν και μετά τον απογαλακτισμό θα πρέπει να λαμβάνει αποκλειστικό αναγνωριστικό κωδικό με τη χρήση κατάλληλης ανώδυνης μεθόδου ταυτοποίησης νεογνών (π.χ. 24).

Ένταξη των ζώων για δοκιμές λειτουργικών ιδιοτήτων και συμπεριφοράς, αξιολόγηση του βάρους του εγκεφάλου και νευροπαθολογική αξιολόγηση

13. Η μέθοδος δοκιμών επιτρέπει διάφορες προσεγγίσεις όσον αφορά την ένταξη των ζώων που εκτίθενται ενδομητρίως και μέσω του θηλασμού σε δοκιμές λειτουργικών ιδιοτήτων και συμπεριφοράς, προσδιορισμού της σεξουαλικής ωρίμασης και του βάρους του εγκεφάλου και νευροπαθολογικής αξιολόγησης (25). Μπορούν να προστεθούν, κατά περίπτωση, και άλλες δοκιμές νευροσυμπεριφορικής λειτουργίας (π.χ. κοινωνική συμπεριφορά), νευροχημείας ή νευροφυσιολογίας, εφόσον δεν θέτουν σε κίνδυνο την αρτιότητα των αρχικών απαιτούμενων δοκιμών.
14. Την 4η ΜΓΗ ή μετά από αυτήν επιλέγονται νεογνά από κάθε ομάδα δόσης και κατανέμονται για τις αξιολογήσεις των τελικών σημείων. Η επιλογή των νεογνών πρέπει να εξασφαλίζει, στο μέτρο του δυνατού, την ίση εκπροσώπηση των δύο φύλων από κάθε γέννα σε κάθε ομάδα δόσης και σε όλες τις δοκιμές. Για τον έλεγχο της κινητικής δραστηριότητας θα πρέπει να υποβάλλεται σε δοκιμή το ίδιο ζεύγος αρσενικών και θηλυκών νεογνών σε κάθε ηλικία πριν από τον απογαλακτισμό (βλ. παράγραφο 35). Για όλους τους άλλους ελέγχους, το ίδιο ή διαφορετικά ζεύγη αρσενικών και θηλυκών ζώων μπορούν να υποβάλλονται σε διαφορετικές δοκιμές συμπεριφοράς. Ενδέχεται να είναι αναγκαία η ένταξη διαφορετικών νεογνών στις δοκιμές γνωσιακής λειτουργίας απογαλακτισμένων ζώων και στις αντίστοιχες δοκιμές σε ενήλικα ζώα προκειμένου να μη γίνεται σύγχυση με τις επιδράσεις της ηλικίας και της προηγούμενης εκπαίδευσης στις μετρήσεις αυτές (26)(27). Τα νεογνά που δεν έχουν επιλεγεί για δοκιμή είναι δυνατόν να θανατώνονται ανώδυνα μετά τον απογαλακτισμό (21η ΜΓΗ). Κάθε αλλαγή στην ένταξη νεογνών στις δοκιμές θα πρέπει να αναφέρεται. Η στατιστική μονάδα μέτρησης πρέπει να είναι η γέννα (ή η μητέρα) και όχι το νεογνό.
15. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι κατανομής των νεογνών στις εξετάσεις πριν και μετά τον απογαλακτισμό, τις γνωσιακές δοκιμές, τις παθολογικές εξετάσεις κ.λπ. (βλ. σχήμα 1 για τον γενικό σχεδιασμό και προσάρτημα 1 για παραδείγματα ένταξης στις δοκιμές). Οι συνιστώμενοι ελάχιστοι αριθμοί ζώων σε κάθε ομάδα δόσης για τις εξετάσεις πριν και μετά τον απογαλακτισμό είναι οι εξής:

Κλινικές παρατηρήσεις και σωματικό βάρος	Όλα τα ζώα
Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις	20/φύλο (1/φύλο/γέννα)
Βάρος εγκεφάλου (μετά από μονιμοποίηση), 11η-22η ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)
Βάρος εγκεφάλου (χωρίς μονιμοποίηση), ~70ή ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)
Νευροπαθολογία (μονιμοποίηση με εμβάπτιση ή έγχυση), 11η-22η ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)
Νευροπαθολογία (μονιμοποίηση με έγχυση), ~ 70ή ΜΓΗ	10/φύλο (1/γέννα)

Σεξουαλική ωρίμανση	20/φύλο (1/φύλο/γένηνα)
Άλλα ορόσημα ανάπτυξης (προαιρετικά)	Όλα τα ζώα
Οντογένεση συμπεριφοράς	20/φύλο (1/φύλο/γένηνα)
Κινητική δραστηριότητα	20/φύλο (1/φύλο/γένηνα)
Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία	20/φύλο (1/φύλο/γένηνα)
Μάθηση και μνήμη	10/φύλο ^(α) (1/γένηνα)

^(α) Ανάλογα με την ευαισθησία των δοκιμών γνωστικής λειτουργίας, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο μελέτης μεγαλύτερου αριθμού ζώων, π.χ. έως 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ζώο ανά γένηνα (για τους τρόπους ένταξης των ζώων στις δοκιμές βλ. προσάρτημα 1) [περαιτέρω οδηγίες για το μέγεθος του δείγματος παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (8)].

Δοσολογία

16. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσης και ένας συντρέχων μάρτυρας. Τα διαστήματα μεταξύ των επιπέδων δόσης θα πρέπει να εξασφαλίζουν τη διαβάθμιση των τοξικών επιδράσεων. Εάν δεν υπάρχουν περιορισμοί λόγω του φυσικοχημικού χαρακτήρα ή των βιολογικών ιδιοτήτων της χημικής ουσίας, το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο την επαγωγή τοξικότητας στις μητέρες (π.χ. κλινικά σημεία, μειωμένη αύξηση σωματικού βάρους (όχι άνω του 10 %) και/ή ενδείξεις δοσοπεριοριστικής τοξικότητας σε όργανο-στόχο). Η υψηλή δόση μπορεί να περιορίζεται σε 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, με ορισμένες εξαιρέσεις. Παραδείγματος χάριν, η αναμενόμενη έκθεση του ανθρώπου μπορεί να δείξει αν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης. Εναλλακτικά, θα πρέπει να εκπονούνται πιλοτικές μελέτες ή προκαταρκτικές μελέτες καθορισμού του εύρους για τον προσδιορισμό της μέγιστης δοσολογίας που θα χρησιμοποιηθεί και η οποία θα πρέπει να προκαλεί τον ελάχιστο απαιτούμενο βαθμό τοξικότητας στη μητέρα. Εάν έχει αποδειχθεί, μέσω τυπικής μελέτης αναπτυξιακής τοξικότητας ή πιλοτικής μελέτης, ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι τοξική στην ανάπτυξη, το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να είναι η μέγιστη δόση που δεν θα προκαλέσει υπερβολική τοξικότητα στους απογόνους ή ενδομήτριο ή νεογνικό θάνατο ή δυσμορφίες, σε βαθμό που να αποκλείει την ουσιαστική αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Το κατώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να έχει ως στόχο την απουσία ενδείξεων τοξικότητας στη μητέρα ή στην ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της νευροτοξικότητας. Θα πρέπει να επιλέγεται φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσης ώστε να καταδεικνύονται η σχέση δόσης-απόκρισης και το επίπεδο στο οποίο δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL) ή δόσεις κοντά στο όριο ανίχνευσης που επιτρέπουν τον προσδιορισμό της δόσης αναφοράς. Συχνά, η βέλτιστη επιλογή για τον καθορισμό των ελαττούμενων επιπέδων δόσης είναι τα υποδιπλάσια ή υποτετραπλάσια διαστήματα μεταξύ αυτών, ενώ είναι πολλές φορές προτιμότερο να προστίθεται και τέταρτη ομάδα δοκιμής αντί να χρησιμοποιούνται πολύ μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων (π.χ. μεγαλύτερο από 10πλάσιο).
17. Κατά την επιλογή των επιπέδων δόσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλα τα υπάρχοντα δεδομένα τοξικότητας, καθώς και πρόσθετα στοιχεία για τον μεταβολισμό και την τοξικοκινητική της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή συγγενών υλικών. Τα στοιχεία αυτά ενδέχεται να διευκολύνουν επίσης την κατάδειξη της καταλληλότητας του δοσολογικού σχήματος. Θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο απευθείας χορήγησης δόσεων σε νεογνά βάσει στοιχείων που αφορούν την έκθεση και τη φαρμακοκινητική (28)(29). Πριν από την εκπόνηση μελετών με απευθείας χορήγηση δόσεων θα πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα (30).
18. Η αντίστοιχη ομάδα μάρτυρα θα πρέπει να είναι ομάδα μαρτύρων υποβαλλόμενη σε εικονική αγωγή (sham) ή ομάδα μαρτύρων στους οποίους χορηγείται ο φορέας, εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Σε όλα τα ζώα θα πρέπει κανονικά να χορηγείται ο ίδιος όγκος ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή φορέα, βάσει του σωματικού βάρους. Εάν χρησιμοποιείται φορέας ή άλλο πρόσθετο για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: οι επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό ή την κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, οι επιδράσεις στις χημικές ιδιότητες της που ενδέχεται να μεταβάλλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και οι επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων. Ο φορέας πρέπει να μην έχει επιδράσεις που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ερμηνεία της μελέτης και να μην είναι τοξικός στη νευροσυμπεριφορά, ούτε να επιδρά στην αναπαραγωγή ή την ανάπτυξη. Στην περίπτωση χρήσης νέων (καινοτομικών) φορέων, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται και ομάδα μαρτύρων υποβαλλόμενη σε εικονική αγωγή επιπλέον της ομάδας μαρτύρων όπου χορηγείται ο φορέας. Η μεταχείριση των ζώων των ομάδων μαρτύρων θα πρέπει να είναι ακριβώς ίδια με εκείνη των ζώων των ομάδων δοκιμών.

Χορήγηση δόσεων

19. Η ελεγχόμενη χημική ουσία ή ο φορέας θα πρέπει να χορηγούνται από την οδό μέσω της οποίας είναι πιθανότερη η έκθεση του ανθρώπου και με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία για τον μεταβολισμό και την κατανομή στα ζώα της δοκιμής. Η οδός χορήγησης είναι γενικά η στοματική (με στομαχικό καθετήρα, μέσω της τροφής, μέσω του πόσιμου νερού), αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες οδοί (π.χ. δερματική, αναπνευστική) ανάλογα με τα χαρακτηριστικά και τις προβλεπόμενες ή γνωστές οδούς έκθεσης του ανθρώπου [περαιτέρω οδηγίες παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 43 (8)]. Η επιλεγόμενη οδός χορήγησης θα πρέπει να αιτιολογείται. Η ελεγχόμενη χημική ουσία θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα.
20. Η χορηγούμενη σε κάθε ζώο δόση θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στο πλέον πρόσφατο προσδιορισθέν σωματικό βάρος του. Ωστόσο, οι δόσεις θα πρέπει να ρυθμίζονται με ιδιαίτερη προσοχή κατά τη διάρκεια του τελευταίου τρίτου της κύησης. Εάν παρατηρείται υπερβολική τοξικότητα στις υπό αγωγή μητέρες, αυτές θα πρέπει να θανατώνονται ανώδυνα.
21. Η ελεγχόμενη χημική ουσία ή ο φορέας θα πρέπει να χορηγείται τουλάχιστον καθημερινά στα ζευγαρωμένα θηλυκά ζώα από την εμφύτευση (HK 6) έως το τέλος της γαλουχίας (21η ΜΓΗ), έτσι ώστε τα νεογνά να εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία κατά την προγεννητική και τη μεταγεννητική νευρολογική τους ανάπτυξη. Η ηλικία στην οποία αρχίζει η χορήγηση των δόσεων, καθώς και η διάρκεια και η συχνότητα χορήγησης, μπορούν να προσαρμόζονται, εάν υπάρχουν στοιχεία που συνηγορούν υπέρ ενός πειραματικού σχεδιασμού με μεγαλύτερη συνάφεια προς την έκθεση του ανθρώπου. Η διάρκεια χορήγησης των δόσεων θα πρέπει να προσαρμόζεται στην περίπτωση άλλων ειδών, ώστε να εξασφαλίζεται η έκθεση κατά τη διάρκεια όλων των αρχικών σταδίων ανάπτυξης του εγκεφάλου (δηλ. στάδια ισοδύναμα με την προγεννητική και την πρώιμη μεταγεννητική ανάπτυξη του ανθρώπινου εγκεφάλου). Η χορήγηση δόσεων μπορεί να αρχίζει από την έναρξη της κυοφορίας (HK 0), αν και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα απώλειας πριν από την εμφύτευση εξαιτίας της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Ο κίνδυνος αυτός αποφεύγεται αν η χορήγηση αρχίσει την 6η HK, αλλά στην περίπτωση αυτή η αγωγή δεν καλύπτει τα αναπτυξιακά στάδια μεταξύ των HK 0 και 6. Όταν ένα εργαστήριο αγοράζει ζώα που έχουν ζευγαρώσει σε συγκεκριμένη ημερομηνία, είναι πρακτικά ανέφικτο να αρχίσει η χορήγηση δόσεων την HK 0, οπότε η 6η HK αποτελεί καλή ημέρα έναρξης. Το εργαστήριο δοκιμών θα πρέπει να καθορίζει το δοσολογικό σχήμα ανάλογα με τις σχετικές πληροφορίες για τις επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, την προηγούμενη πείρα του και παραμέτρους υλικοτεχνικής υποδομής. Το εν λόγω σχήμα μπορεί να περιλαμβάνει παράταση της χορήγησης δόσεων και μετά τον απογαλακτισμό. Δεν θα πρέπει να χορηγείται δόση την ημέρα του τοκετού στα ζώα που δεν έχουν γεννήσει όλους τους απογόνους τους. Γενικά, υποτίθεται ότι τα νεογνά εκτίθενται μέσω του μητρικού γάλακτος. Ωστόσο, όταν δεν υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία συνεχούς έκθεσης των απογόνων, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο απευθείας χορήγησης δόσεων στα νεογνά. Η συνεχής έκθεση μπορεί να αποδειχθεί, λόγω χάριν, από στοιχεία για τη φαρμακοκινητική, την τοξικότητα στους απογόνους ή από αλλαγές στους βιοδείκτες (28).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**Παρατηρήσεις στις μητέρες**

22. Όλες οι μητέρες θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή, τουλάχιστον μία φορά ημερησίως, όσον αφορά τη γενική κατάσταση της υγείας τους, συμπεριλαμβανομένης της νοσηρότητας και της θνησιμότητας.
23. Κατά τις περιόδους αγωγής και παρατήρησης, τουλάχιστον δέκα μητέρες ανά επίπεδο δόσης θα πρέπει να υποβάλλονται περιοδικά σε λεπτομερέστερες κλινικές παρατηρήσεις (τουλάχιστον δύο φορές κατά την περίοδο χορήγησης δόσεων στη διάρκεια της κύησης και δύο φορές κατά την περίοδο χορήγησης δόσεων στη διάρκεια της γαλουχίας). Εκπαιδευμένοι τεχνικοί, που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία υποβάλλονται τα ζώα, θα πρέπει να τα παρατηρούν έξω από τους κλωβούς, εφαρμόζοντας τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να ελαχιστοποιούνται το άγχος των ζώων και η μεροληψία του παρατηρητή και να μεγιστοποιείται η αξιοπιστία μεταξύ παρατηρητών. Συνιστάται να αναλαμβάνει ο ίδιος τεχνικός τις παρατηρήσεις στο πλαίσιο δεδομένης μελέτης, εφόσον είναι δυνατόν.
24. Θα πρέπει να καταγράφεται η παρουσία των παρατηρούμενων σημείων και, εφόσον είναι εφικτό, η έκτασή τους. Οι κλινικές παρατηρήσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν, χωρίς η απαρτίμηση αυτή να είναι περιοριστική, αλλαγές στο δέρμα, στο τρίχωμα, στους οφθαλμούς και στους βλεννογόνους, την εμφάνιση εκκρίσεων και τη δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση του τριχώματος, μεταβολή του μεγέθους της κόρης των οφθαλμών, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής και/ή αναπνοή από το στόμα και τυχόν ανωμαλίες ούρησης και κενώσεων).
25. Θα πρέπει επίσης να σημειώνονται οι ασυνήθεις αποκρίσεις όσον αφορά τη θέση του σώματος, τη δραστηριότητα (π.χ. αύξηση ή μείωση της διάθεσης εξερεύνησης του τυποποιημένου χώρου) και τον συντονισμό των κινήσεων. Θα πρέπει να καταγράφονται ακόμη οι αλλαγές στη βάδιση (π.χ. ταλάντευση, αταξία), στη στάση του σώματος (π.χ. κύρτωση της ράχης) και στην αντίδραση στους χειρισμούς, την τοποθέτηση και σε άλλα ερεθίσματα από το περιβάλλον, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κρίσεων, σπασμών, τρόμου και στερεότυπων κινήσεων (π.χ. υπερβολική περιποίηση του τριχώματος, ασυνήθεις κινήσεις της κεφαλής, συνεχείς περιστροφές), η περιέργη συμπεριφορά (π.χ. δήγματα ή υπερβολική λείξη, αυτοακρωτηριασμός, οπισθοβάδιση, φώνηση) και η επιθετικότητα.

26. Θα πρέπει να καταγράφονται τα σημεία τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων της ημέρας και ώρας εκδήλωσης, του βαθμού και της διάρκειάς τους.
27. Τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται την ώρα που χορηγείται η δόση, τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και την ημέρα του τοκετού ή κοντά σε αυτή και την 21η ΜΓΗ (απογαλακτισμός). Στις μελέτες με χρήση στομαχικού καθετήρα, οι μητέρες θα πρέπει να ζυγίζονται τουλάχιστον δύο φορές εβδομαδιαίως. Οι δόσεις θα πρέπει να ρυθμίζονται αναλόγως κατά τον χρόνο προσδιορισμού του σωματικού βάρους. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται σε εβδομαδιαία βάση, τουλάχιστον κατά την κύηση και τη γαλουχία. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω του πόσιμου νερού, θα πρέπει να μετράται η κατανάλωση νερού τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση.

Παρατηρήσεις στους απογόνους

28. Όλοι οι απόγονοι θα πρέπει να παρατηρούνται με προσοχή, τουλάχιστον ημερησίως, για σημεία τοξικότητας, καθώς και για νοσηρότητα και θνησιμότητα.
29. Κατά τις περιόδους αγωγής και παρατήρησης, οι απόγονοι θα πρέπει να υποβάλλονται σε λεπτομερέστερες κλινικές παρατηρήσεις. Εκπαιδευμένοι τεχνικοί που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία υποβάλλονται τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούν τους απογόνους (τουλάχιστον 1 νεογνό/φύλο/γέννα), εφαρμόζοντας τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να ελαχιστοποιείται η μεροληψία και να μεγιστοποιείται η αξιοπιστία μεταξύ παρατηρητών. Συνιστάται να αναλαμβάνει τις παρατηρήσεις ο ίδιος τεχνικός, εφόσον είναι δυνατόν. Θα πρέπει να παρακολουθούνται τουλάχιστον τα τελικά σημεία που περιγράφονται στις παραγράφους 24 και 25, όπως ενδείκνυται για το παρατηρούμενο στάδιο της ανάπτυξης.
30. Θα πρέπει να καταγράφονται όλα τα τελικά σημεία τοξικότητας στους απογόνους, συμπεριλαμβανομένων της ημέρας και ώρας εκδήλωσης, του βαθμού και της διάρκειάς τους.

Ορόσημα σωματικής διάπλασης και ανάπτυξης

31. Οι αλλαγές στα ορόσημα ανάπτυξης πριν από τον απογαλακτισμό (π.χ. εκτύλιξη του περυγίου του ωτός, άνοιγμα των οφθαλμών, εμφάνιση κοπτήρων) συσχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με το σωματικό βάρος (30)(31). Το σωματικό βάρος αποτελεί ίσως τον καλύτερο δείκτη σωματικής ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, συνιστάται να μετρώνται τα ορόσημα ανάπτυξης μόνο όταν υπάρχουν προγενέστερες ενδείξεις ότι θα προκύψουν πρόσθετες πληροφορίες από τα συγκεκριμένα τελικά σημεία. Ο χρόνος αξιολόγησης των παραμέτρων αυτών αναφέρεται στον πίνακα 1. Ανάλογα με τις προβλεπόμενες επιδράσεις και τα αποτελέσματα των αρχικών μετρήσεων, ενδέχεται να είναι σκόπιμη η προσθήκη και άλλων χρονικών σημείων ή η εκτέλεση των μετρήσεων σε άλλα στάδια της ανάπτυξης.
32. Είναι σκόπιμο να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της σωματικής ανάπτυξης η μετά τη συνουσία ηλικία αντί της μεταγεννητικής ηλικίας (33). Εάν τα νεογνά εξετάζονται την ημέρα του απογαλακτισμού, συνιστάται να προηγηθεί η εξέταση αυτή του καθαυτού απογαλακτισμού, ώστε να αποφεύγεται το πειραματικό σφάλμα λόγω του άγχους που συνδέεται με τον απογαλακτισμό. Επιπλέον, δεν θα πρέπει να εξετάζονται τα νεογνά κατά τις δύο πρώτες ημέρες μετά τον απογαλακτισμό.

Πίνακας 1

Χρόνος αξιολόγησης των οροσήμων σωματικής διάπλασης και ανάπτυξης και τελικά σημεία λειτουργιών/συμπεριφοράς ^(α)

Τελικά σημεία	Ηλικιακές περιόδους	Πριν από τον απογαλακτισμό ^(β)	Ήβη ^(β)	Νεαρά ενήλικα ζώα ^(β)
Ορόσημα σωματικής διάπλασης και ανάπτυξης				
Σωματικό βάρος και κλινικές παρατηρήσεις	Εβδομαδιαίως ^(γ)	τουλάχιστον ανά δύο εβδομάδες	τουλάχιστον ανά δύο εβδομάδες	
Βάρος εγκεφάλου		22η ΜΓΗ ^(δ)		κατά τη λήξη της μελέτης
Νευροπαθολογία		22η ΜΓΗ ^(δ)		κατά τη λήξη της μελέτης
Σεξουαλική ωρίμαση		—	κατά περίπτωση	—
Άλλα ορόσημα ανάπτυξης ^(ε)		κατά περίπτωση	—	—

Τελικά σημεία	Ηλικιακές περιόδους	Πριν από τον απογαλακτισμό ^(β)	Ήβη ^(β)	Νεαρά ενήλικα ζώα ^(β)
Τελικά σημεία λειτουργιών/συμπεριφοράς				
Οντογένεση συμπεριφοράς		Τουλάχιστον δύο μετρήσεις		
Κινητική δραστηριότητα (συμπεριλαμβανομένης της εξοικείωσης)		1-3 φορές ^(στ)	—	μία φορά
Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία		—	μία φορά	μία φορά
Μάθηση και μνήμη		—	μία φορά	μία φορά

^(α) Στον πίνακα παρουσιάζεται η ελάχιστη συχνότητα μετρήσεων. Ανάλογα με τις προβλεπόμενες επιδράσεις και τα αποτελέσματα των αρχικών μετρήσεων, ενδέχεται να είναι σκόπιμη η προσθήκη και άλλων χρονικών σημείων (π.χ. ηλικιωμένα ζώα) ή η εκτέλεση των μετρήσεων σε άλλα στάδια της ανάπτυξης.

^(β) Συνιστάται να μην εξετάζονται τα νεογνά κατά τις δύο πρώτες ημέρες μετά τον απογαλακτισμό (βλ. παράγραφο 32). Συνιστώμενες ηλικίες για τις δοκιμές κατά την περίοδο της ήβης: μάθηση και μνήμη = (25±2)η ΜΓΗ, κινητική και αισθητηριακή λειτουργία = (25±2)η ΜΓΗ. Η συνιστώμενη ηλικία για τις δοκιμές σε νεαρά ενήλικα ζώα είναι η 60ή-70ή ΜΓΗ.

^(γ) Σε περίπτωση απευθείας χορήγησης δόσεων σε νεογνά, το σωματικό βάρος θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον δύο φορές εβδομαδιαίως, για τη ρύθμιση των δόσεων όταν η αύξηση του σωματικού βάρους είναι ταχεία.

^(δ) Το βάρος του εγκεφάλου και τα νευροπαθολογικά ευρήματα μπορούν να αξιολογούνται νωρίτερα (π.χ. την 11η ΜΓΗ), εάν κρίνεται σκόπιμο (βλ. παράγραφο 39).

^(ε) Θα πρέπει να καταγράφονται και άλλα ορόσημα ανάπτυξης πέραν του σωματικού βάρους (π.χ. άνοιγμα των οφθαλμών), όταν κρίνεται σκόπιμο (βλ. παράγραφο 31).

^(στ) Βλ. παράγραφο 35.

33. Θα πρέπει να καταμετρώνται τα ζωντανά νεογνά και να προσδιορίζεται το φύλο τους, π.χ. με οπτική εξέταση ή μέτρηση της πρωκτογεννητικής απόστασης (34)(35). Κάθε νεογνό μιας γέννας θα πρέπει να ζυγίζεται κατά τη γέννησή του ή αμέσως μετά, τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως καθ' όλη την περίοδο γαλουχίας και τουλάχιστον μία φορά ανά δύο εβδομάδες στη συνέχεια. Εφόσον αξιολογείται η σεξουαλική ωριμότητα, θα πρέπει να προσδιορίζονται, τουλάχιστον σε ένα αρσενικό και ένα θηλυκό ζώο ανά γέννα, η ηλικία και το σωματικό βάρος του ζώου όταν εμφανίζεται άνοιγμα του κόλπου (36) ή διαχωρισμός της πόσθης (37).

Οντογένεση συμπεριφοράς

34. Θα πρέπει να μετράται η οντογένεση επιλεγμένων συμπεριφορών σε ένα τουλάχιστον νεογνό/φύλο/γέννα κατά την κατάλληλη ηλικιακή περίοδο και να χρησιμοποιούνται τα ίδια νεογνά όλες τις ημέρες δοκιμής για όλες τις αξιολογούμενες συμπεριφορές. Οι ημέρες μέτρησης θα πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανομημένες στην εν λόγω περίοδο ώστε να καθορίζονται οι φυσιολογικές ή οι σχετικές με την αγωγή μεταβολές της οντογένεσης της εκάστοτε συμπεριφοράς (38). Παραδείγματα συμπεριφορών των οποίων η οντογένεση θα μπορούσε να αξιολογηθεί είναι το διορθωτικό αντανακλαστικό, ο αρνητικός γεωτακτισμός και η κινητική δραστηριότητα (38)(39)(40).

Κινητική δραστηριότητα

35. Θα πρέπει να παρακολουθείται η κινητική δραστηριότητα (41)(42)(43)(44)(45) κατά την ηλικιακή περίοδο πριν από τον απογαλακτισμό και κατά την ενήλικη ζωή. Για την εξέταση κατά τον χρόνο του απογαλακτισμού, βλ. παράγραφο 32. Η συνδεδεμένη εξέταση θα πρέπει να έχει αρκετά μεγάλη διάρκεια ώστε να καταδεικνύεται η ενδοσυνεδριακή εξοικείωση των μαρτύρων που δεν υποβάλλονται σε αγωγή. Συνιστάται ιδιαίτερα η χρήση της κινητικής δραστηριότητας για την αξιολόγηση της οντογένεσης συμπεριφοράς. Εάν η κινητική δραστηριότητα χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς, θα πρέπει να εξετάζονται τα ίδια ζώα σε όλες τις συνεδρίες πριν από τον απογαλακτισμό. Οι εξετάσεις θα πρέπει να είναι αρκετά συχνές ώστε να αξιολογείται η οντογένεση της ενδοσυνεδριακής εξοικείωσης (44). Για τον σκοπό αυτό ενδέχεται να απαιτούνται τρεις ή περισσότερες χρονικές περιόδους πριν από τον απογαλακτισμό, συμπεριλαμβανομένης της ημέρας απογαλακτισμού (π.χ. 13η, 17η και 21η ΜΓΗ). Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα ίδια ζώα ή ζώα της ίδιας γέννας σε στάδιο της ενήλικης ζωής τους κοντά στη λήξη της μελέτης (π.χ. 60ή-70ή ΜΓΗ). Εάν είναι απαραίτητο, μπορούν να προστεθούν και άλλες ημέρες εξέτασης. Η κινητική δραστηριότητα θα πρέπει να παρακολουθείται με συσκευή αυτόματης καταγραφής δραστηριοτήτων, ικανή να ανιχνεύει τόσο τις αυξήσεις όσο και τις μειώσεις τους (δηλ. η δραστηριότητα γραμμής βάσης που μετράται από τη συσκευή δεν θα πρέπει να είναι τόσο χαμηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση μειώσεων ούτε τόσο υψηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση αυξήσεων της δραστηριότητας). Κάθε συσκευή θα πρέπει να ελέγχεται με τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να διασφαλίζεται, στο μέτρο του δυνατού, η αξιοπιστία της

λειτουργίας όλων των συσκευών, όλες τις ημέρες. Εφόσον είναι δυνατόν, οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι ισόρροπα καταναμημένες στις διάφορες συσκευές. Κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζεται χωριστά. Οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι αντισταθμισμένες ως προς τους χρόνους εξέτασης ώστε να αποφεύγονται πειραματικά σφάλματα οφειλόμενα στους κικαδιους ρυθμούς. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσπάθεια ώστε οι διακυμάνσεις των συνθηκών δοκιμής να είναι ελάχιστες και να μη σχετίζονται συστηματικά με την αγωγή. Μεταξύ των μεταβλητών που μπορούν να επηρεάσουν πολλά μέτρα συμπεριφοράς, συμπεριλαμβανομένης της κινητικής δραστηριότητας, συγκαταλέγονται η κλητική στάθμη, το μέγεθος και το σχήμα του κλωβού δοκιμής, η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, οι συνθήκες φωτός, οι οσμές, η χρήση των κλωβών στέγασης ή νέων κλωβών δοκιμής και οι περισπασμοί που προέρχονται από το περιβάλλον.

Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία

36. Η κινητική και αισθητηριακή λειτουργία θα πρέπει να εξετάζονται λεπτομερώς τουλάχιστον μία φορά κατά την περίοδο της ήβης και μία φορά κατά την πρώτη περίοδο ενήλικης ζωής (π.χ. την 60ή-70ή ΜΓΗ). Για την εξέταση κατά τον χρόνο απογαλακτισμού, βλ. παράγραφο 32. Θα πρέπει να εκτελούνται επαρκείς δοκιμασίες ώστε να διασφαλίζεται κατάλληλη ποσοτική δειγματοληψία των αισθητηριακών διαδικασιών (σωματοαισθητικές, αιθουσαίες) και των κινητικών λειτουργιών (π.χ. δύναμη, συντονισμός). Παραδείγματα δοκιμασιών της κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας είναι το ωτιαίο αντανακλαστικό εκτατικού σπασμού (46), το διορθωτικό αντανακλαστικό (47)(48), η εξοικείωση με τον αιφνιδιασμό από ακουστικό ερέθισμα (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) και τα προκλητά δυναμικά (55).

Δοκιμασίες μάθησης και μνήμης

37. Θα πρέπει να εκτελείται δοκιμασία συσχετιστικής μάθησης και μνήμης μετά τον απογαλακτισμό (π.χ. ημέρα 25 ± 2) και σε νεαρά ενήλικα ζώα (από την 60ή ΜΓΗ και έπειτα). Για την υποβολή στη δοκιμασία κατά τον χρόνο απογαλακτισμού, βλ. παράγραφο 32. Σε αυτά τα δύο στάδια ανάπτυξης μπορούν να χρησιμοποιούνται οι ίδιες ή χωριστές δοκιμασίες. Παρέχεται ευελιξία στην επιλογή δοκιμασιών μάθησης και μνήμης για απογαλακτισμένους και ενήλικες επίμους. Ωστόσο, οι δοκιμασίες θα πρέπει να είναι σχεδιασμένες κατά τρόπο ώστε να πληρούν δύο κριτήρια. Πρώτον, η μάθηση θα πρέπει να αξιολογείται είτε ως μεταβολή μεταξύ διαφόρων επαναλαμβανόμενων πειραμάτων ή συνεδριών μάθησης ή, στην περίπτωση των δοκιμασιών που περιλαμβάνουν μόνο ένα πείραμα, μεταβολή σε σχέση με μια κατάσταση βάσει της οποίας ελέγχονται οι μη συσχετιστικές επιδράσεις της εκπαίδευσης. Δεύτερον, οι δοκιμασίες θα πρέπει να περιλαμβάνουν κάποιο μέτρο της μνήμης (βραχυπρόθεσμης ή μακροπρόθεσμης) πέραν της αρχικής μάθησης (απόκτηση γνώσεων), το οποίο όμως δεν μπορεί να αναφέρεται εάν δεν έχει προκύψει από την ίδια δοκιμασία μέτρο της απόκτησης γνώσεων. Εάν από τις δοκιμασίες μάθησης και μνήμης προκύψει επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, μπορεί να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής συμπληρωματικών δοκιμασιών για να αποκλειστούν εναλλακτικές ερμηνείες βάσει αλλαγών στις αισθητηριακές ή κινητικές ικανότητες ή στις ικανότητες που συνδέονται με κίνητρα συμπεριφοράς. Επιπλέον των ανωτέρω δύο κριτηρίων, συνιστάται να επιλέγεται η δοκιμασία μάθησης και μνήμης με βάση την αποδεδειγμένη ευαισθησία της στην κατηγορία της εξεταζόμενης χημικής ουσίας, εάν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες στη βιβλιογραφία. Παραδείγματα δοκιμασιών που μπορούν να διεξάγονται για την εκπλήρωση των ανωτέρω κριτηρίων, όταν δεν υπάρχουν τέτοιες πληροφορίες, είναι τα εξής: παθητική αποφυγή (43)(56)(57), καθυστέρηση ταύτισης αντικειμένου με θέση σε ενήλικους (58) και ανήλικους επίμους (59), οσφρητική εξάρτηση (43)(60), υδατικός λαβύρινθος κατά Morris (61)(62)(63), λαβύρινθος κατά Biel ή Cincinnati (64)(65), λαβύρινθος ακτινωτών βραχιόνων (66), λαβύρινθος T (43) και υιοθέτηση και διατήρηση ελεγχόμενης βάσει προγράμματος συμπεριφοράς (26)(67)(68). Πρόσθετες δοκιμές περιγράφονται στη βιβλιογραφία, για απογαλακτισμένους (26)(27) και ενήλικους επίμους (19)(20).

Μεταθανάτια εξέταση

38. Οι μητέρες μπορούν να υποβάλλονται σε ευθανασία μετά τον απογαλακτισμό των απογόνων.
39. Διενεργείται νευροπαθολογική αξιολόγηση των απογόνων με τη χρήση ιστών από ζώα που έχουν θανατωθεί ανώδυνα την 22η ΜΓΗ ή νωρίτερα, μεταξύ της 11ης και της 22ης ΜΓΗ, καθώς και κατά τη λήξη της μελέτης. Στην περίπτωση των απογόνων που θανατώνονται έως και την 22η ΜΓΗ, θα πρέπει να αξιολογούνται ιστοί του εγκεφάλου, ενώ στην περίπτωση των ζώων που θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης, θα πρέπει να αξιολογούνται ιστοί τόσο του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), όσο και του περιφερειακού (ΠΝΣ). Τα ζώα που θανατώνονται την 22η ΜΓΗ ή νωρίτερα μπορούν να μονιμοποιούνται είτε με εμβάπτιση είτε με έγχυση. Τα ζώα που θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης θα πρέπει να μονιμοποιούνται με έγχυση. Θα πρέπει να εφαρμόζεται σχεδιασμός με αντιστάθμιση για όλες τις πτυχές της παρασκευής ιστικών δειγμάτων, από την έγχυση του μέσου στέρωσης στα ζώα και την ανατομή των ιστών έως την επεξεργασία των δειγμάτων τους και τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών, ώστε κάθε παρτίδα να περιέχει αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα δόσης. Πρόσθετες οδηγίες για τη νευροπαθολογία παρέχονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 20 του ΟΟΣΑ (9), βλ. επίσης (103).

Επεξεργασία των δειγμάτων ιστών

40. Θα πρέπει να σημειώνονται όλες οι μακροσκοπικές ανωμαλίες που είναι εμφανείς κατά τη νεκροψία. Τα λαμβανόμενα δείγματα ιστών θα πρέπει να αντιπροσωπεύουν όλες τις σημαντικές περιοχές του νευρικού συστήματος, να διατηρούνται σε κατάλληλο μέσο μονιμοποίησης και να υποβάλλονται σε επεξεργασία σύμφωνα με τυποποιημένα δημοσιευμένα ιστολογικά πρωτόκολλα (69)(70)(71) (103). Ο εγκλεισμός σε παραφίνη είναι αποδεκτός για τους ιστούς του ΚΝΣ και του ΠΝΣ, αλλά ενδέχεται να είναι σκόπιμη η χρήση οσμίου μετά τη μονιμοποίηση, σε συνδυασμό με εγκλεισμό σε εποξειδική ρητίνη, όταν απαιτείται υψηλότερος βαθμός ανάλυσης (π.χ. για περιφερειακά νεύρα, όταν υπάρχουν υπόνοιες περιφερειακής νευροπάθειας και/ή για τη μορφομετρική ανάλυση περιφερειακών νεύρων. Οι εγκεφαλικοί ιστοί που συλλέγονται

για μορφομετρική ανάλυση θα πρέπει να εγκλείονται σε κατάλληλα μέσα σε όλα τα επίπεδα δόσης ταυτόχρονα, ώστε να αποφεύγονται τεχνικά σφάλματα λόγω συρρίκνωσης που μπορεί να συνδέονται με παρατεταμένη φύλαξη σε μέσο μονιμοποίησης (6).

Νευροπαθολογική εξέταση

41. Η ποιοτική εξέταση αποσκοπεί στον προσδιορισμό:

- i) των περιοχών του νευρικού συστήματος που εμφανίζουν ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων·
- ii) των τύπων των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων που οφείλονται στην έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία και
- iii) του βαθμού σοβαρότητας των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων.

Θα πρέπει να εξετάζονται μικροσκοπικά από κατάλληλα εκπαιδευμένο παθολογοανατόμο αντιπροσωπευτικές ιστολογικές τομές από τα δείγματα ιστών, για ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων. Όλες οι νευροπαθολογικές αλλοιώσεις θα πρέπει να βαθμολογούνται υποκειμενικά βάσει της σοβαρότητάς τους. Η χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης ενδέχεται να επαρκεί για την αξιολόγηση τομών του εγκεφάλου των ζώων που θανατώνονται ανώδυνα την 22η ΜΓΗ ή ωρύτερα. Ωστόσο, συνιστάται χρώση μυελίνης (π.χ. luxol fast blue/ cresyl violet) και χρώση αργύρου (π.χ. χρώση Bielschowsky ή Bodians) για τομές ιστών του ΚΝΣ και του ΠΝΣ των ζώων που θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης. Κατά την επαγγελματική κρίση του παθολογοανατόμου και ανάλογα με το είδος των αλλοιώσεων που παρατηρούνται, μπορούν και άλλες χρώσεις να θεωρηθούν κατάλληλες για τον προσδιορισμό και τον χαρακτηρισμό ιδιαίτερων τύπων αλλοιώσεων [π.χ. ιστοχημική χρώση οξίνης γλοιακής ινδικής πρωτεΐνης (GFAP) ή με λεκτίνες για την αξιολόγηση νευρογλοιακών και μικρονευρογλοιακών αλλοιώσεων (72), χρώση fluoro-jade για την ανίχνευση νέκρωσης (73)(74) ή χρώσεις αργύρου ειδικές για τον νευροεκφυλισμό (75)].

42. Θα πρέπει να διενεργείται μορφομετρική (ποσοτική) αξιολόγηση, διότι τα σχετικά δεδομένα μπορούν να υποβοηθήσουν την ανίχνευση επιδράσεων που σχετίζονται με την αγωγή και έχουν μεγάλη αξία για την ερμηνεία των σχετικών με την αγωγή διαφορών βάρους ή μορφολογίας του εγκεφάλου (76)(77). Θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα νευρικού ιστού και να προετοιμάζονται για μορφομετρική αξιολόγηση, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει, παραδείγματος χάριν, γραμμικές ή εμβαδικές μετρήσεις συγκεκριμένων περιοχών του εγκεφάλου (78). Για τις γραμμικές ή εμβαδικές μετρήσεις απαιτείται η χρήση ομόλογων τομών, επιλεγμένων με προσοχή και βάσει αξιόπιστων μικροσκοπικών σημείων αναφοράς (6). Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στερεολογία για τον προσδιορισμό σχετικών με την αγωγή επιδράσεων σε παραμέτρους όπως ο όγκος ή ο αριθμός κυττάρων συγκεκριμένων νευροανατομικών περιοχών (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Θα πρέπει να εξετάζεται ο εγκέφαλος για ενδείξεις σχετικών με την αγωγή νευροπαθολογικών αλλοιώσεων και να λαμβάνονται κατάλληλα δείγματα από όλες τις σημαντικές περιοχές του (π.χ. οσφρητικοί βολβοί, φλοιός εγκεφάλου, ιππόκαμπος, βασικά γάγγλια, θάλαμος, υποθάλαμος, μεσεγκέφαλος (τετράδυμο, καλύπτρα και εγκεφαλικά σκέλη), γέφυρα, προμήκης μυελός, παρεγκεφαλίδα), ώστε να εξασφαλίζεται ενδελεχής εξέταση. Είναι σημαντικό να λαμβάνονται οι τομές στο ίδιο επίπεδο από όλα τα ζώα. Στην περίπτωση των ενήλικων ζώων που θανατώνονται ανώδυνα κατά τη λήξη της μελέτης, θα πρέπει να λαμβάνονται δείγματα αντιπροσωπευτικών τομών του νωτιαίου μυελού και του ΠΝΣ. Οι εξεταζόμενες περιοχές θα πρέπει να περιλαμβάνουν τον οφθαλμό με το οπτικό νεύρο και τον αμφιβληστροειδή, τον νωτιαίο μυελό στο ύψος του αυχενικού και του οσφυϊκού ογκώματος, τις ίνες της ραχιαίας και της κοιλιακής ρίζας, το εγγύς ισχιακό νεύρο, το εγγύς κνημιαίο νεύρο (στο γόνατο) και τους κλάδους του κνημιαίου νεύρου στον γαστροκνήμιο μυ. Οι τομές νωτιαίου μυελού και περιφερειακών νεύρων θα πρέπει να είναι τόσο εγκάρσιες, όσο και διαμήκεις.

44. Πέραν των κυτταρικών αλλοιώσεων (π.χ. σχηματισμός κενοτοπιών, εκφυλισμός, νέκρωση στους νευρώνες) και των αλλαγών στους ιστούς (π.χ. γλοίωση, διείσδυση λεμφοκυττάρων, σχηματισμός κύστεων), η νευροπαθολογική αξιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει εξέταση για ενδείξεις βλαβών στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (6)(85)(86)(87)(88)(89). Είναι σημαντική εν προκειμένω η διάκριση μεταξύ επιδράσεων που σχετίζονται με την αγωγή και φυσιολογικών αναπτυξιακών συμβάντων, τα οποία είναι γνωστό ότι λαμβάνουν χώρα στο στάδιο της ανάπτυξης που αντιστοιχεί στον χρόνο θανάτωσης (90). Παραδείγματα σημαντικών αλλοιώσεων που είναι ενδεικτικές προσβολής του νευρικού συστήματος κατά την ανάπτυξη του, είναι μεταξύ άλλων, τα εξής:

- μεταβολές του μακροσκοπικού μεγέθους ή σχήματος των οσφρητικών βολβών, του εγκεφάλου ή της παρεγκεφαλίδας·
- μεταβολές του σχετικού μεγέθους διαφόρων εγκεφαλικών περιοχών, συμπεριλαμβανομένων των αυξήσεων ή μειώσεων του μεγέθους τους που οφείλονται στην απώλεια ή την παραμονή φυσιολογικά παροδικών πληθυσμών κυττάρων ή νευραξονικών προβολών (π.χ. εξωτερικό βλαστικό στρώμα της παρεγκεφαλίδας, μεσολόβιο)·
- αλλαγές στον πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση και τη διαφοροποίηση, ενδείξεις των οποίων αποτελούν οι περιοχές εκτεταμένης απόπτωσης ή νέκρωσης, οι συστάδες ή διάσπαρτοι πληθυσμοί έκτοπων, αποπροσανατολισμένων ή παραμορφωμένων νευρώνων και οι μεταβολές του σχετικού μεγέθους διαφόρων στρωμάτων των δομών του εγκεφαλικού φλοιού·

- αλλαγές στα πρότυπα μυελίνωσης, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η συνολική μείωση του μεγέθους των μυελινωμένων δομών ή μεταβολές της χρώσης τους·
- ενδείξεις υδροκέφαλου, ειδικότερα διεύρυνση των κοιλιών, στένωση του υδραγωγού και λέπτυνση των ημισφαιρίων του εγκεφάλου.

Ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης στις νευροπαθολογικές αλλοιώσεις

45. Για την ποιοτική και ποσοτική νευροπαθολογική ανάλυση συνιστάται η ακόλουθη βαθμιδωτή διαδικασία. Πρώτον, τομές από την ομάδα υψηλής δόσης συγκρίνονται με τομές από την ομάδα μαρτύρων. Εάν δεν εντοπιστούν ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων στα ζώα της ομάδας υψηλής δόσης, δεν απαιτείται περαιτέρω ανάλυση. Εάν εντοπιστούν ενδείξεις νευροπαθολογικών αλλοιώσεων στην ομάδα υψηλής δόσης, εξετάζονται ζώα των ομάδων ενδιάμεσης και χαμηλής δόσης. Σε περίπτωση τερματισμού της μελέτης για την ομάδα υψηλής δόσης, λόγω θανάτων ή άλλης τοξικότητας που προκαλεί πειραματικό σφάλμα, οι ομάδες υψηλής και ενδιάμεσης δόσης θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση για τον εντοπισμό νευροπαθολογικών αλλοιώσεων. Εάν υπάρχουν ενδείξεις νευροτοξικότητας στις ομάδες χαμηλότερων δόσεων, οι ομάδες αυτές θα πρέπει να υποβάλλονται σε νευροπαθολογική ανάλυση. Εάν κατά την ποιοτική ή την ποσοτική εξέταση διαπιστωθούν σχετικές με την αγωγή νευροπαθολογικές αλλοιώσεις, θα πρέπει να προσδιοριστούν η εξάρτηση της επίπτωσης από τη δόση, καθώς και η συχνότητα και η σοβαρότητα των αλλοιώσεων ή των μορφομετρικών αλλαγών, με βάση αξιολόγηση όλων των ζώων όλων των ομάδων δόσης. Η αξιολόγηση αυτή θα πρέπει να περιλαμβάνει όλες τις εγκεφαλικές περιοχές που παρουσιάζουν ενδείξεις νευροπαθολογικής αλλοίωσης. Για κάθε τύπο αλλοίωσης, θα πρέπει να περιγράφονται τα χαρακτηριστικά που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό κάθε βαθμού σοβαρότητας, με αναφορά των γνωρισμάτων που χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση των βαθμών. Θα πρέπει να καταγράφονται η συχνότητα κάθε τύπου βλάβης και ο βαθμός σοβαρότητάς της και να εκτελείται στατιστική ανάλυση για την αξιολόγηση του είδους της σχέσης δόσης-απόκρισης. Συνιστάται η χρήση κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων πλακών (91).

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

46. Τα δεδομένα θα πρέπει να αναφέρονται κατ' άτομο και να συνοψίζονται σε πίνακα, στον οποίο εμφανίζονται, για κάθε ομάδα δοκιμής, τα είδη των αλλαγών και ο αριθμός των μητέρων, των απογόνων κατά φύλο και των γενιών που εμφάνισαν κάθε είδος αλλαγής. Σε περίπτωση απευθείας μεταγεννητικής έκθεσης των απογόνων, θα πρέπει να αναφέρονται η οδός, η διάρκεια και η περίοδος έκθεσης.

Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

47. Η μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας παρέχει πληροφορίες για τις επιδράσεις της επανειλημμένης έκθεσης σε μια χημική ουσία ενδομητρίως και κατά τα πρώτα στάδια της μεταγεννητικής ανάπτυξης. Δεδομένου ότι δίνεται έμφαση σε τελικά σημεία τόσο γενικής τοξικότητας όσο και αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, τα αποτελέσματα της μελέτης επιτρέπουν τη διάκριση μεταξύ των επιδράσεων στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος χωρίς γενική τοξικότητα στη μητέρα και εκείνων που εκφράζονται μόνον σε επίπεδα τα οποία είναι τοξικά και στη μητέρα. Λόγω των πολύπλοκων διασυνδέσεων μεταξύ του σχεδιασμού της μελέτης, της στατιστικής ανάλυσης και της βιολογικής σημαντικότητας των δεδομένων, απαιτείται η κρίση των ειδικών για την κατάλληλη ερμηνεία των δεδομένων αναπτυξιακής νευροτοξικότητας (107)(109). Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της δοκιμής θα πρέπει να εφαρμόζεται προσέγγιση βασισμένη στο βάρος της μαρτυρίας (20)(92)(93)(94). Θα πρέπει να συζητούνται τα πρότυπα των σχετικών με τη συμπεριφορά ή τη μορφολογία ευρημάτων, εφόσον υπάρχουν, καθώς και οι ενδείξεις για τη σχέση δόσης-απόκρισης. Στον εν λόγω χαρακτηρισμό θα πρέπει να περιλαμβάνονται δεδομένα από όλες τις μελέτες που αφορούν την αξιολόγηση της αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων των επιδημιολογικών μελετών σε ανθρώπους ή εκθέσεων περιστατικών και των πειραματικών μελετών σε ζώα (π.χ. τοξικοκινητικά δεδομένα, πληροφορίες για τη σχέση δομής-δράσης, δεδομένα από άλλες μελέτες τοξικότητας). Σε αυτά περιλαμβάνεται η σχέση μεταξύ των δόσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και της παρουσίας ή απουσίας, της συχνότητας εμφάνισης (επίπτωση) και της έκτασης των νευροτοξικών επιδράσεων σε κάθε φύλο (20)(95).
48. Η αξιολόγηση των δεδομένων θα πρέπει να περιλαμβάνει συζήτηση τόσο της βιολογικής, όσο και της στατιστικής σημαντικότητας. Η στατιστική ανάλυση θα πρέπει να θεωρείται εργαλείο που κατευθύνει αλλά δεν καθορίζει την ερμηνεία των δεδομένων. Η έλλειψη στατιστικής σημαντικότητας δεν θα πρέπει να αποτελεί τον μοναδικό λόγο συναγωγής του συμπεράσματος ότι η αγωγή δεν έχει επιδράσεις και, αντιστρόφως, η στατιστική σημαντικότητα δεν θα πρέπει να αποτελεί το μοναδικό λόγο συναγωγής του συμπεράσματος ότι η αγωγή έχει επιδράσεις. Θα πρέπει να συζητούνται τα διαθέσιμα δεδομένα για θετικούς και ιστορικούς μάρτυρες, ιδίως όταν δεν εντοπίζονται σχετικές με την αγωγή επιδράσεις, ως ένας τρόπος προφύλαξης από πιθανά ψευδαρνητικά ευρήματα και από τις δυσκολίες που ενέχει η "απόδειξη της απουσίας" (102)(106). Η πιθανότητα ψευδοθετικών ευρημάτων θα πρέπει να συζητείται υπό το πρίσμα της συνολικής στατιστικής αξιολόγησης των δεδομένων (96). Η αξιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη σχέση μεταξύ των νευροπαθολογικών αλλοιώσεων και των αλλαγών στη συμπεριφορά που παρατηρήθηκαν, εάν υπάρχει..

49. Θα πρέπει να αναλύονται όλα τα αποτελέσματα με τη χρήση στατιστικών μοντέλων κατάλληλων για τον σχεδιασμό του πειράματος (108). Η επιλογή παραμετρικής ή μη παραμετρικής ανάλυσης θα πρέπει να αιτιολογείται λαμβανομένων υπόψη παραγόντων όπως η φύση των δεδομένων (μετασχηματισμένα ή μη) και η κατανομή τους, καθώς και η σχετική ανθεκτικότητα της επιλεγμένης στατιστικής ανάλυσης. Η επιλογή στατιστικών αναλύσεων θα πρέπει να βασίζεται στο σκοπό και τον σχεδιασμό της μελέτης ώστε να ελαχιστοποιούνται τα σφάλματα τύπου I (ψευδοθετικά) και τύπου II (ψευδαρνητικά) (96)(97)(104)(105). Στις μελέτες ανάπτυξης με τη χρήση πολύτοκων ειδών, κατά τις οποίες υποβάλλονται σε δοκιμή πολλά νεογνά ανά γέννα, το στατιστικό μοντέλο θα πρέπει να περιλαμβάνει τη γέννα ώστε να αποφεύγονται διογκωμένα ποσοστά σφαλμάτων τύπου I (98)(99)(100)(101). Η στατιστική μονάδα μέτρησης θα πρέπει να είναι η γέννα και όχι το νεογνό. Τα πειράματα θα πρέπει να σχεδιάζονται κατά τρόπο ώστε τα νεογνά της ίδιας γέννας να μην αντιμετωπίζονται ως ανεξάρτητες παρατηρήσεις. Κάθε τελικό σημείο που μετράται επανειλημμένα στο ίδιο υποκείμενο θα πρέπει να αναλύεται με τη χρήση στατιστικών μοντέλων που λαμβάνουν υπόψη την έλλειψη ανεξαρτησίας αυτών των μετρήσεων.

Έκθεση δοκιμής

50. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

- φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες·
- στοιχεία ταυτότητας, συμπεριλαμβανομένης της προέλευσης·
- καθαρότητα του παρασκευάσματος και/ή αναμενόμενες προσμείξεις.

Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό ή φυσιολογικό ορό.

Πειραματόζωα:

- χρησιμοποιούμενο είδος και στέλεχος και αιτιολόγηση, εάν δεν χρησιμοποιούνται επίμυες·
- προμηθευτής των πειραματόζωων·
- αριθμός, ηλικία κατά την έναρξη της δοκιμής και φύλο των ζώων·
- προέλευση, συνθήκες στέγασης, τροφή, νερό κ.λπ.·
- βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής.

Συνθήκες δοκιμής:

- αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·
- αιτιολόγηση της οδού και της χρονικής περιόδου χορήγησης των δόσεων·
- προδιαγραφές των δόσεων που χορηγήθηκαν, με λεπτομέρειες για τον φορέα, τον όγκο και τη φυσική μορφή της ύλης που χορηγήθηκε·
- λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/τροφής και την επιτευχθείσα συγκέντρωση, σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος·
- μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των μητέρων και των απογόνων·
- λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών τυχαιοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την κατανομή των μητέρων στις ομάδες αγωγής, την επιλογή ακατάλληλων νεογνών για απομάκρυνση και την κατανομή των νεογνών στις ομάδες δοκιμής·
- λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης ουσίας·
- κατά περίπτωση, μετατροπή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην τροφή/στο πόσιμο νερό ή κατά την εισπνοή (ppm) σε πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα)·
- περιβαλλοντικές συνθήκες·
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (π.χ. νερό βρύσης, απεσταγμένο)·
- ημερομηνίες έναρξης και λήξης της μελέτης.

Διαδικασίες παρατήρησης και εξέτασης:

- λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των παρατηρήσεων και των διαδικασιών, καθώς και λειτουργικοί ορισμοί για τη βαθμολόγηση των παρατηρήσεων·
- κατάλογος όλων των διαδικασιών εξέτασης που χρησιμοποιήθηκαν και αιτιολόγηση της χρήσης τους·
- λεπτομέρειες για τις διαδικασίες συμπεριφορικών/λειτουργικών, παθολογικών, νευροχημικών ή ηλεκτροφυσιολογικών εξετάσεων που χρησιμοποιήθηκαν, με πληροφορίες και στοιχεία για τις αυτόματες συσκευές·
- διαδικασίες βαθμονόμησης και εξασφάλισης της ισοδυναμίας των συσκευών και της εξισορρόπησης των ομάδων αγωγής στις διαδικασίες εξέτασεων·
- συνοπτική εξήγηση των αποφάσεων που περιλαμβάνουν κρίση επαγγελματιών.

Αποτελέσματα (ατομικά και συνοπτικά, συμπεριλαμβανομένης της μέσης τιμής και της μεταβλητότητας, όταν κρίνεται σκόπιμο):

- αριθμός ζώων κατά την έναρξη και κατά τη λήξη της μελέτης·
- αριθμός ζώων και γέννες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μέθοδο δοκιμασιών·
- αριθμός ταυτότητας κάθε ζώου και της γέννας από την οποία προήλθε·
- μέγεθος γέννας και μέσο βάρος κατά τη γέννηση, ανά φύλο·
- δεδομένα για το σωματικό βάρος και τη μεταβολή του, συμπεριλαμβανομένου του σωματικού βάρους των μητέρων και των απογόνων κατά τη λήξη της μελέτης·
- δεδομένα για την κατανάλωση τροφής και, εάν κρίνεται σκόπιμο, για την κατανάλωση νερού (π.χ. εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του νερού)·
- δεδομένα για τις τοξικές αντιδράσεις ανά φύλο και δόση, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας ή θνησιμότητας, καθώς και του χρόνου και της αιτίας θανάτου, εάν κρίνεται σκόπιμο·
- είδος, σοβαρότητα, διάρκεια, ημέρα και ώρα εκδήλωσης και εξέλιξη των λεπτομερών κλινικών παρατηρήσεων·
- βαθμολογία κάθε ορόσημου ανάπτυξης (βάρος, σεξουαλική ωρίμαση και οντογένεση συμπεριφοράς) σε κάθε χρόνο παρατήρησης·
- λεπτομερής περιγραφή όλων των συμπεριφορικών, λειτουργικών, νευροπαθολογικών, νευροχημικών και ηλεκτροφυσιολογικών ευρημάτων ανά φύλο, συμπεριλαμβανομένων των αυξήσεων και μειώσεων σε σχέση με τις ομάδες μαρτύρων·
- ευρήματα νεκροψίας·
- βάρος εγκεφάλου·
- τυχόν διαγνώσεις που βασίστηκαν σε νευρολογικά σημεία και αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φυσικών απαντώμενων ασθενειών ή παθολογικών καταστάσεων·
- εικόνες αντιπροσωπευτικών ευρημάτων·
- εικόνες χαμηλής ισχύος για την αξιολόγηση της ομολογίας των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για μορφομετρία·
- δεδομένα απορρόφησης και μεταβολισμού, συμπεριλαμβανομένων συμπληρωματικών δεδομένων από χωριστή μελέτη τοξικοκινητικής, εάν υπάρχουν·
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των στατιστικών μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων, και αποτελέσματα, ανεξαρτήτως της σημαντικότητάς τους·
- κατάλογος του προσωπικού που συμμετείχε στη μελέτη, με αναφορά της επαγγελματικής του κατάρτισης.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων:

- πληροφορίες για τη σχέση δόσης-απόκρισης, ανά φύλο και ομάδα·
- συνεκτίμηση άλλων τοξικών επιδράσεων για τη συναγωγή συμπεράσματος σχετικά με το νευροτοξικό δυναμικό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ανά φύλο και ομάδα·

- επιπτώσεις τοξικοκινητικών στοιχείων στα συμπεράσματα·
- ομοιότητα επιδράσεων με γνωστές νευροτοξικές ουσίες·
- δεδομένα που τεκμηριώνουν την αξιοπιστία και την ευαισθησία της μεθόδου δοκιμών (π.χ. δεδομένα για θετικούς και ιστορικούς μάρτυρες)·
- σχέσεις μεταξύ των νευροπαθολογικών και των λειτουργικών επιδράσεων, εάν υπάρχουν·
- NOAEL ή δόση αναφοράς για μητέρες και απογόνους, ανά φύλο και ομάδα.

Συμπεράσματα:

- συζήτηση της γενικής ερμηνείας των δεδομένων με βάση τα αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου συμπεράσματος σχετικά με το κατά πόσον η ελεγχόμενη χημική ουσία προκάλεσε αναπτυξιακή νευροτοξικότητα και του NOAEL.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (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. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [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. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [<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 No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008 Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- (9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- (10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173-292.
- (11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
- (12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188-197.
- (13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

- (14) Κεφάλαιο Β.34 του παρόντος παραρτήματος: Τοξικολογική δοκιμασία αναπαραγωγής μιας γενεάς.
- (15) Κεφάλαιο Β.35 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή δυο γενεών.
- (16) Κεφάλαιο Β.43 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη νευροτοξικότητας σε τρωκτικά.
- (17) Κεφάλαιο Β.31 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη προγεννητικής τοξικότητας στην ανάπτυξη.
- (18) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς, ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 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. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [<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. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supplem/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.

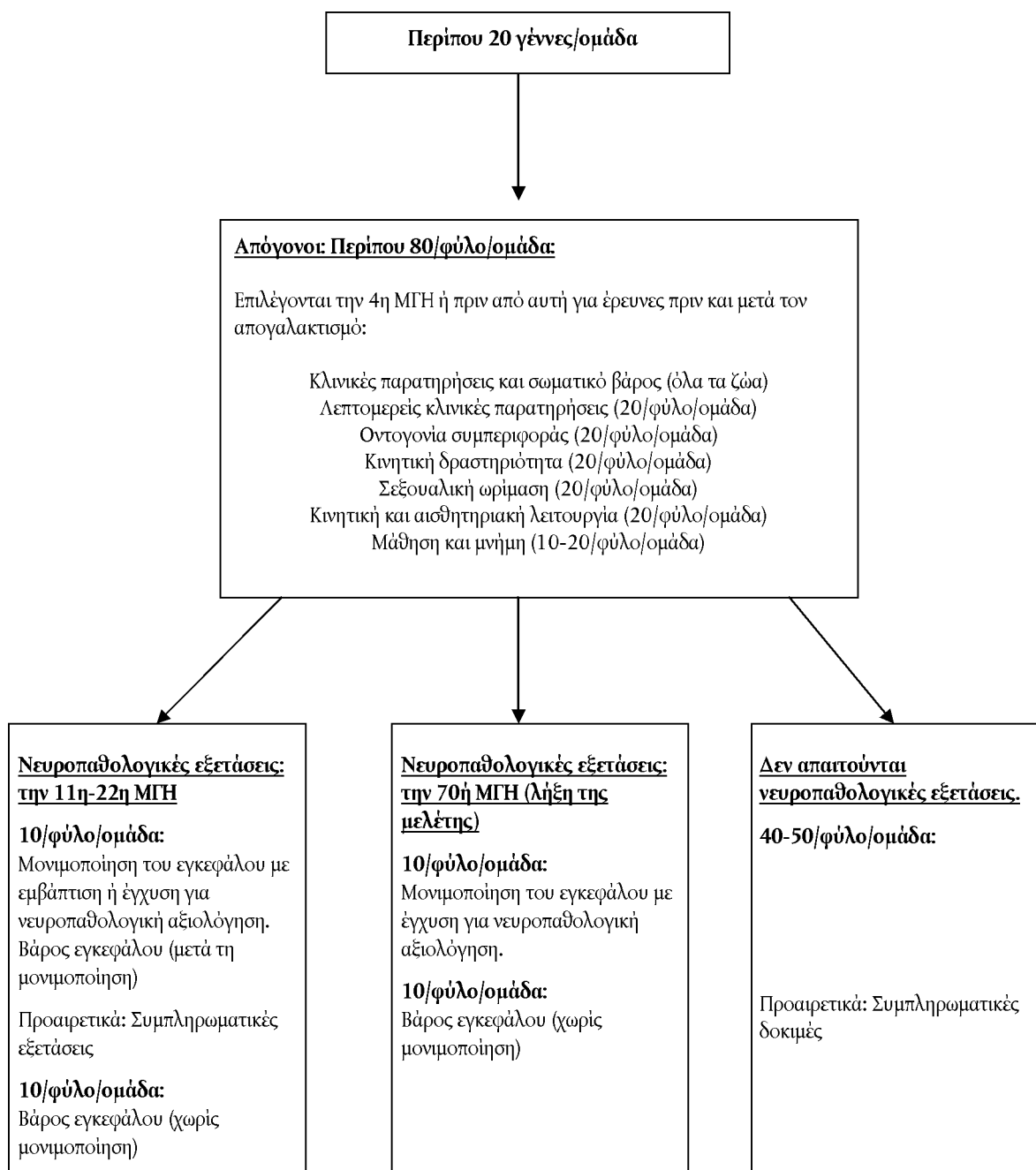
- (57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247-296.
- (58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed 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-nitrosourea 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 neuropathologica 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.

Σχήμα 1

Γενικό διάγραμμα δοκιμής για λειτουργικές/συμπεριφορικές δοκιμασίες, νευροπαθολογική αξιολόγηση και προσδιορισμό του βάρους του εγκεφάλου. Το διάγραμμα αυτό βασίζεται στην περιγραφή στις παραγράφους 13-15 (ΜΓΗ = μεταγεννητική ημέρα). Παραδείγματα ένταξης των ζώων στις δοκιμές παρατίθενται στο προσάρτημα 1



Προσάρτημα 1

1. Ακολουθώς περιγράφονται και παρουσιάζονται σε πίνακα παραδείγματα πιθανών τρόπων ένταξης των ζώων στις δοκιμές. Τα παραδείγματα αυτά παρέχονται για να εξηγηθεί ότι η ένταξη των ζώων της μελέτης στις διάφορες τυπικές δοκιμασίες μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικούς τρόπους.

Παράδειγμα 1

2. Χρησιμοποιείται ένα σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) για τον έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς πριν από τον απογαλακτισμό. Από αυτά, 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται ανώδυνα την 22η ΜΓΗ. Αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Επιπλέον, συλλέγονται δεδομένα για το βάρος του εγκεφάλου με τη χρήση εγκεφάλων που δεν έχουν μονιμοποιηθεί από τα εναπομένοντα 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά επίπεδο δόσης.
3. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για λειτουργικές/συμπεριφορικές δοκιμασίες μετά τον απογαλακτισμό (λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις και δοκιμασίες κινητικής δραστηριότητας, αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα και γνωσιακής λειτουργίας σε ζώα στην ήβη) και για την εκτίμηση της ηλικίας σεξουαλικής ωρίμασης. Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) υποβάλλονται σε αναισθησία και μονιμοποίηση με έγχυση κατά τη λήξη της μελέτης (την 70ή ΜΓΗ περίπου). Έπειτα από πρόσθετη μονιμοποίηση *in situ*, αφαιρείται ο εγκέφαλος και υποβάλλεται σε επεξεργασία για νευροπαθολογική αξιολόγηση.
4. Για τη δοκιμασία γνωσιακής λειτουργίας σε νεαρά ενήλικα ζώα (π.χ. την 60ή-70ή ΜΓΗ), χρησιμοποιείται ένα τρίτο σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα). Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/ομάδα (1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης και ο εγκέφαλός τους αφαιρείται και ζυγίζεται.
5. Τα υπόλοιπα 20 ζώα/φύλο/ομάδα διατηρούνται για ενδεχόμενες συμπληρωματικές δοκιμές.

Πίνακας 1

Αύξων αριθμός νεογνού ⁽⁴⁾		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	β		
1	5	20 α + 20 β 10 α + 10 β 10 α + 10 β	Οντογένεση συμπεριφοράς Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία την 22η ΜΓΗ Βάρος εγκεφάλου την 22η ΜΓΗ
2	6	20 α + 20 β 20 α + 20 β 20 α + 20 β 20 α + 20 β 20 α + 20 β 10 α + 10 β	Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις Κινητική δραστηριότητα Σεξουαλική ωρίμαση Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία Μάθηση και μνήμη (25η ΜΓΗ) Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία νεαρών ενήλικων ζώων ~ 70ή ΜΓΗ
3	7	20 α + 20 β 10 α + 10 β	Μάθηση και μνήμη (νεαρά ενήλικα ζώα) Βάρος εγκεφάλου νεαρών ενήλικων ζώων ~ 70ή ΜΓΗ
4	8	—	Εφεδρικά ζώα για αντικαταστάσεις ή συμπληρωματικές δοκιμές

⁽⁴⁾ Στο συγκεκριμένο παράδειγμα επιλέγονται από τις γέννες 4 αρσενικά + 4 θηλυκά ζώα· τα αρσενικά αριθμούνται από το 1 έως το 4 και τα θηλυκά από το 5 έως το 8.

Παράδειγμα 2

6. Χρησιμοποιείται ένα σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) για τον έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς πριν από τον απογαλακτισμό. Από αυτά, 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται ανώδυνα την 11η ΜΓΗ. Αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για ιστοπαθολογική αξιολόγηση.
7. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για εξετάσεις μετά τον απογαλακτισμό (λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις, κινητική δραστηριότητα, εκτίμηση της ηλικίας σεξουαλικής ωρίμασης και της κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας). Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) υποβάλλονται σε αναισθησία και μονιμοποίηση με έγχυση κατά τη λήξη της μελέτης (την 70ή ΜΓΗ περίπου). Έπειτα από πρόσθετη μονιμοποίηση *in situ*, αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για νευροπαθολογική αξιολόγηση.
8. Για τη δοκιμασία γνωσιακής λειτουργίας σε ζώα στην ήβη και νεαρά ενήλικα ζώα χρησιμοποιούνται 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα). Χρησιμοποιούνται διαφορετικά ζώα στις δοκιμασίες γνωσιακής λειτουργίας την 23η ΜΓΗ και σε νεαρά ενήλικα ζώα. Κατά τη λήξη της μελέτης, τα 10 ζώα/φύλο/ομάδα που υποβλήθηκαν στη δοκιμασία ως ενήλικα θανατώνονται και ο εγκέφαλός τους αφαιρείται και ζυγίζεται.
9. Τα υπόλοιπα 20 ζώα/φύλο/ομάδα που δεν επιλέχθηκαν για τη δοκιμασία θανατώνονται και απορρίπτονται κατά τον απογαλακτισμό.

Πίνακας 2

Αύξων αριθμός νεογνού ^(α)		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
1	5	20 α + 20 θ 10 α + 10 θ	Οντογένεση συμπεριφοράς Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία την 11η ΜΓΗ
2	6	20 α + 20 θ 20 α + 20 θ 20 α + 20 θ 20 α + 20 θ 10 α + 10 θ	Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις Κινητική δραστηριότητα Σεξουαλική ωρίμαση Κινητική και αισθητηριακή λειτουργία Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία νεαρών ενήλικων ζώων ~70ή ΜΓΗ
3	7	10 α + 10 θ ^(β)	Μάθηση και μνήμη (23η ΜΓΗ)
3	7	10 α + 10 θ ^(β)	Μάθηση και μνήμη (νεαρά ενήλικα ζώα) Βάρος εγκεφάλου νεαρών ενήλικων ζώων
4	8	—	Ζώα που θανατώνονται και απορρίπτονται την 21η ΜΓΗ

^(α) Στο συγκεκριμένο παράδειγμα επιλέγονται από τις γέννες 4 αρσενικά + 4 θηλυκά ζώα· τα αρσενικά αριθμούνται από το 1 έως το 4 και τα θηλυκά από το 5 έως το 8.

^(β) Χρησιμοποιούνται διαφορετικά νεογνά στις δοκιμασίες γνωσιακής λειτουργίας την 23η ΜΓΗ και σε νεαρά ενήλικα ζώα (π.χ. νεογνά με περιτό/άρτιο αριθμό από το σύνολο των 20 ζώων).

Παράδειγμα 3

10. Χρησιμοποιείται ένα σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) για προσδιορισμό του βάρους του εγκεφάλου και νευροπαθολογική αξιολόγηση την 11η ΜΓΗ. Από αυτά, 10 νεογνά/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται ανώδυνα την 11η ΜΓΗ και ο εγκέφαλός τους αφαιρείται, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για ιστοπαθολογική αξιολόγηση. Επιπλέον, συλλέγονται δεδομένα για το βάρος του εγκεφάλου με τη χρήση εγκεφάλων που δεν έχουν μονιμοποιηθεί από τα εναπομένοντα 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα ανά επίπεδο δόσης.

11. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για έλεγχο της οντογένεσης συμπεριφοράς (κινητική δραστηριότητα), εξετάσεις μετά τον απογαλακτισμό (κινητική δραστηριότητα και εκτίμηση της ηλικίας σεξουαλικής ωρίμασης) και δοκιμασίες γνωσιακής λειτουργίας σε ζώα στην ήβη.
12. Ένα άλλο σύνολο 20 ζώων/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για δοκιμασίες κινητικής και αισθητηριακής λειτουργίας (αιφνιδιασμός από ακουστικό ερέθισμα) και λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις. Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) υποβάλλονται σε αναισθησία και μονιμοποίηση με έγχυση κατά τη λήξη της μελέτης (την 70ή ΜΓΗ περίπου). Έπειτα από πρόσθετη μονιμοποίηση in situ, αφαιρείται ο εγκέφαλος, ζυγίζεται και υποβάλλεται σε επεξεργασία για νευροπαθολογική αξιολόγηση.
13. Ένα άλλο σύνολο 20 νεογνών/φύλο/επίπεδο δόσης (ήτοι, 1 αρσενικό και 1 θηλυκό ανά γέννα) χρησιμοποιείται για τη δοκιμασία γνωσιακής λειτουργίας σε νεαρά ενήλικα ζώα. Από αυτά, 10 ζώα/φύλο/ομάδα (ήτοι, 1 αρσενικό ή 1 θηλυκό ανά γέννα) θανατώνονται κατά τη λήξη της μελέτης και ο εγκέφαλος τους αφαιρείται και ζυγίζεται.

Πίνακας 3

Αύξων αριθμός νεογνού ^(α)		Αριθμός νεογνών στη δοκιμασία	Εξέταση/δοκιμασία
α	θ		
1	5	10 α + 10 θ 10 α + 10 θ	Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία την 11η ΜΓΗ Βάρος εγκεφάλου την 11η ΜΓΗ
2	6	20 α + 20 θ 20 α + 20 θ 20 α + 20 θ 20 α + 20 θ	Οντογένεση συμπεριφοράς (κινητική δραστηριότητα) Κινητική δραστηριότητα Σεξουαλική ωρίμαση Μάθηση και μνήμη (27η ΜΓΗ)
3	7	20 α + 20 θ 20 α + 20 θ 10 α + 10 θ	Αιφνιδιασμός από ακουστικό ερέθισμα (ζώα στην ήβη και νεαρά ενήλικα ζώα) Λεπτομερείς κλινικές παρατηρήσεις Βάρος εγκεφάλου/νευροπαθολογία/μορφομετρία νεαρών ενήλικων ζώων ~70ή ΜΓΗ
4	8	20 α + 20 θ 10 α + 10 θ	Μάθηση και μνήμη (νεαρά ενήλικα ζώα) Βάρος εγκεφάλου νεαρών ενήλικων ζώων

^(α) Στο συγκεκριμένο παράδειγμα επιλέγονται από τις γέννες 4 αρσενικά + 4 θηλυκά ζώα· τα αρσενικά αριθμούνται από το 1 έως το 4 και τα θηλυκά από το 5 έως το 8.

*Προσάρτημα 2***Ορισμοί**

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

B.54. ΜΗΤΡΟΤΡΟΦΙΚΟΣ ΒΙΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΤΡΩΚΤΙΚΑ: ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΗ ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 440 (2007). Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας για την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών, και την εκπόνηση νέων, σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών (1). Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών για τον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό σε τρωκτικά. Ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός σε τρωκτικά υποβλήθηκε στη συνέχεια σε εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης, το οποίο περιλάμβανε τη σύνταξη λεπτομερούς εγγράφου τεκμηρίωσης (2)(3) και τη διεξαγωγή εκτενών ενδοεργαστηριακών και διεργαστηριακών μελετών για να καταδειχθεί η συνάφεια και η αναπαραγωγιμότητα του βιοπροσδιορισμού με ένα ισχυρό οιστρογόνο αναφοράς, ασθενείς αγωνιστές υποδοχέων οιστρογόνων, έναν ισχυρό ανταγωνιστή υποδοχέων οιστρογόνων και με μια αρνητική χημική ουσία αναφοράς (4)(5)(6)(7)(8)(9). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών B.54 είναι προϊόν της πείρας που αποκομίστηκε κατά τη διάρκεια του προγράμματος δοκιμών επικύρωσης και των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από αυτό με αγωνιστές οιστρογόνων.
2. Ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός είναι βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής που εμφανίστηκε τη δεκαετία του '30 (27) (28) και τυποποιήθηκε πρώτα από μια επιτροπή εμπειρογνομόνων το 1962 με σκοπό τη διαλογή (32)(35). Βασίζεται στην αύξηση του βάρους της μήτρας ή μητροτροφική αντίδραση [για ανασκόπηση, βλ. (29)] και αξιολογεί την ικανότητα μιας χημικής ουσίας να προκαλεί βιολογικές δραστηριότητες που αντιστοιχούν σε αγωνιστές ή ανταγωνιστές φυσικών οιστρογόνων (π.χ. 17β-οιστραδιόλη). Ωστόσο, η χρήση της για την ανίχνευση ανταγωνιστών είναι λιγότερο συνήθης από ό,τι για την ανίχνευση αγωνιστών. Η μήτρα αντιδρά στα οιστρογόνα με δύο τρόπους. Μια πρώτη αντίδραση είναι η αύξηση του βάρους λόγω της απορρόφησης νερού. Μετά την αντίδραση αυτή ακολουθεί αύξηση του βάρους λόγω της ανάπτυξης των ιστών (30). Οι αντιδράσεις της μήτρας επιμύων και ποντικών είναι ποιοτικά συγκρίσιμες.
3. Ο παρών βιοπροσδιορισμός λειτουργεί ως προσδιορισμός διαλογής *in vivo* και η εφαρμογή του θα πρέπει να εντάσσεται στο "Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών" (προσάρτημα 2). Στο εν λόγω εννοιολογικό πλαίσιο, ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός περιλαμβάνεται στο 3ο επίπεδο ως προσδιορισμός *in vivo* που παρέχει δεδομένα σχετικά με έναν και μόνο ενδοκρινικό μηχανισμό, την οιστρογονικότητα.
4. Προορισμός του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι να συμπεριλαμβάνεται σε μια δέσμη δοκιμών *in vitro* και *in vivo* για τον εντοπισμό χημικών ουσιών που μπορούν να αλληλεπιδρούν με το ενδοκρινικό σύστημα, με τελικό αποτέλεσμα εκτιμήσεις κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον. Στο πρόγραμμα επικύρωσης του ΟΟΣΑ χρησιμοποιήθηκαν τόσο ισχυροί όσο και ασθενείς αγωνιστές οιστρογόνων για να αξιολογηθούν οι επιδόσεις του προσδιορισμού στον εντοπισμό χημικών οιστρογόνων (4)(5)(6)(7)(8). Ως εκ τούτου, πέραν της καλής ενδοεργαστηριακής και διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, καταδείχθηκε σαφώς η ευαισθησία της διαδικασίας δοκιμών στους αγωνιστές οιστρογόνων.
5. Όσον αφορά τις αρνητικές ενώσεις, στο πρόγραμμα επικύρωσης συμπεριελήφθη μόνο μία "αρνητική" χημική ουσία αναφοράς, που ήδη είχε αναφερθεί ως αρνητική σε μητροτροφικό προσδιορισμό, καθώς και σε προσδιορισμούς σύνδεσης με υποδοχέα και υποδοχέων *in vitro*, αλλά αξιολογήθηκαν πρόσθετα δεδομένα δοκιμών που δεν είχαν σχέση με το πρόγραμμα επικύρωσης του ΟΟΣΑ και με τα οποία τεκμηριώθηκε περαιτέρω η ειδικότητα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού για τη διαλογή αγωνιστών των οιστρογόνων (16).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

6. Οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές οιστρογόνων δρουν ως συνδέτες των υποδοχέων οιστρογόνων α και β και μπορούν να ενεργοποιούν ή να αναστέλλουν, αντιστοίχως, τη μεταγραφική δράση των υποδοχέων. Η δράση αυτή ενδεχομένως εγκυμονεί κινδύνους δυσμενών επιδράσεων στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων επιδράσεων στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη. Είναι επομένως αναγκαία η ταχεία εξέταση και αξιολόγηση των χημικών ουσιών ως πιθανών αγωνιστών ή ανταγωνιστών των οιστρογόνων. Η συγγένεια ενός συνδέτη με έναν υποδοχέα οιστρογόνων ή η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων έκφρασης *in vitro*, παρόλο που παρέχει πληροφορίες, είναι απλώς ένας από τους πολλούς παράγοντες που καθορίζουν τον ενδεχόμενο κίνδυνο. Μεταξύ των άλλων καθοριστικών παραγόντων συγκαταλέγονται η μεταβολική ενεργοποίηση και αδρανοποίηση μετά την είσοδο στο σώμα, η κατανομή στους ιστούς-στόχους και η απέκκριση από το σώμα, οι οποίες εξαρτώνται, τουλάχιστον εν μέρει, από την οδό χορήγησης και την ελεγχόμενη χημική ουσία. Ανακύπτει έτσι η ανάγκη ελέγχου της πιθανής δράσης μιας χημικής ουσίας *in vivo* υπό τις σχετικές συνθήκες, εκτός εάν τα χαρακτηριστικά της όσον αφορά την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME) παρέχουν ήδη κατάλληλες πληροφορίες. Οι ιστοί της μήτρας αντιδρούν με ταχεία και έντονη αύξηση στην διέγερση από τα οιστρογόνα, ιδίως στην περίπτωση των εργαστηριακών τρωκτικών, στα οποία ο οιστρικός κύκλος διαρκεί περίπου 4 ημέρες. Είδη τρωκτικών, ιδίως ο επίμυς, χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως σε μελέτες τοξικότητας για τον χαρακτηρισμό των κινδύνων. Συνεπώς, η μήτρα των τρωκτικών αποτελεί κατάλληλο όργανο-στόχο για την *in vivo* διαλογή αγωνιστών και ανταγωνιστών των οιστρογόνων.
7. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ΟΟΣΑ και έχουν αποδειχθεί αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα σε ενδοεργαστηριακές και διεργαστηριακές μελέτες (5)(7). Σήμερα είναι διαθέσιμες δύο μέθοδοι: η μέθοδος στην οποία χρησιμοποιούνται ενήλικα θηλυκά ζώα που έχουν υποβληθεί σε ωθηεκτομή (μέθοδος με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωθηεκτομή) και η μέθοδος στην οποία χρησιμοποιούνται άνηβα ζώα που δεν έχουν υποβληθεί σε ωθηεκτομή (μέθοδος με άνηβα ζώα). Στο πρόγραμμα δοκιμών επικύρωσης του ΟΟΣΑ

καταδείχθηκε ότι και οι δύο μέθοδοι έχουν συγκρίσιμη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα. Ωστόσο, η μέθοδος με άνηθα ζώα, καθώς διατηρεί άθικτο τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG), είναι σχετικά λιγότερο εξειδικευμένη, αλλά καλύπτει μεγαλύτερο πεδίο διερεύνησης σε σύγκριση με τη μέθοδο με ζώα που έχουν υποστεί ωθηκτομή, διότι ανταποκρίνεται σε χημικές ουσίες που αλληλεπιδρούν με τον άξονα HPG και όχι μόνο με τον υποδοχέα οιστρογόνων. Ο άξονας HPG των επιμύων καθίσταται λειτουργικός σε ηλικία περίπου 15 ημερών. Πριν από αυτή, δεν είναι δυνατόν να επιστευστεί η ήβη με αγωγή, π.χ. με ορμόνη έκλυσης γοναδοτροπινών (GnRH). Καθώς τα θηλυκά ζώα πλησιάζουν στην ήβη, πριν από το άνοιγμα του κόλπου, έχουν πολλούς “σιωπηρούς” κύκλους που δεν οδηγούν σε άνοιγμα του κόλπου ή ωορρηξία, αλλά συνεπάγονται ορισμένες ορμονικές διακυμάνσεις. Εάν μια χημική ουσία διεγείρει τον άξονα HPG, άμεσα ή έμμεσα, το αποτέλεσμα είναι πρόωρη ήβη, πρόωρη ωορρηξία και ταχύτερο άνοιγμα του κόλπου. Δεν είναι μόνο οι χημικές ουσίες που επενεργούν στον άξονα HPG υπεύθυνες για το αποτέλεσμα αυτό, αλλά και ορισμένα σιτηρέσια με υψηλότερα επίπεδα μεταβολίσιμης ενέργειας από άλλα διεγείρουν την ανάπτυξη και επιταχύνουν το άνοιγμα του κόλπου, χωρίς να είναι οιστρογόνα. Οι εν λόγω χημικές ουσίες δεν επάγουν μητροτροφική αντίδραση σε ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωθηκτομή, καθώς σε αυτά δεν λειτουργεί ο άξονας HPG.

8. Για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων, θα πρέπει να προτιμάται η μέθοδος στην οποία χρησιμοποιούνται άνηθοι επίμυες, ώστε να αποφεύγονται, αφενός η χειρουργική προετοιμασία των ζώων και, αφετέρου, το ενδεχόμενο να μην χρησιμοποιηθούν τα ζώα που παρουσιάζουν ενδείξεις έναρξης του οιστρικού κύκλου (βλ. παράγραφο 30).
9. Η μητροτροφική αντίδραση δεν οφείλεται αποκλειστικά στα οιστρογόνα, δηλ. είναι δυνατόν να προκληθεί και από άλλες χημικές ουσίες πέραν των αγωνιστών ή ανταγωνιστών των οιστρογόνων. Παραδείγματος χάριν, σχετικά υψηλές δόσεις προγεστερόνης ή διαφόρων συνθετικών προγεστινών μπορούν να οδηγήσουν σε διεγερτική αντίδραση (30). Οποιαδήποτε αντίδραση μπορεί να αποτελέσει το αντικείμενο ιστολογικής ανάλυσης για την ανίχνευση κερατινοποίησης του κόλπου (30). Ανεξαρτήτως του πιθανού αιτίου της αντίδρασης, το θετικό αποτέλεσμα ενός μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού θα πρέπει κανονικά να αποτελεί το έναυσμα για ενέργειες με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση. Συμπληρωματικά αποδεικτικά στοιχεία οιστρογονικότητας θα μπορούσαν να προσέλθουν από προσδιορισμούς *in vitro*, όπως οι προσδιορισμοί σύνδεσης με υποδοχέα οιστρογόνων και μεταγραφικής ενεργοποίησης, ή από άλλους προσδιορισμούς *in vivo*, όπως ο προσδιορισμός σε θηλυκά ζώα στην ήβη.
10. Λαμβανομένου υπόψη ότι ο μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός λειτουργεί ωςπροσδιορισμός διαλογής *in vivo*, η προσέγγιση επικύρωσης που υιοθετήθηκε εξυπηρετούσε τόσο την καλή μεταχείριση των ζώων, όσο και μια στρατηγική βαθμιδωτών δοκιμών. Για τον σκοπό αυτό, οι προσπάθειες επικεντρώθηκαν στην αυστηρή επικύρωση της αναπαραγωγιμότητας και της ευαισθησίας όσον αφορά την οιστρογονικότητα -το κύριο πρόβλημα με πολλές χημικές ουσίες-, ενώ λίγη προσπάθεια καταβλήθηκε όσον αφορά το αντιοιστρογονικό σκέλος του προσδιορισμού. Δεδομένου ότι ο αριθμός των χημικών ουσιών με σαφή χαρακτηριστικά αντιοιστρογόνου (τα οποία δεν επισκιάζονται από οιστρογονική δράση) είναι πολύ περιορισμένος, ελέγχθηκε μόνο ένα αντιοιστρογόνο με ισχυρή δράση. Ως εκ τούτου, η παρούσα μέθοδος δοκιμών περιλαμβάνει αποκλειστικά το πρωτόκολλο με οιστρογόνα, ενώ το πρωτόκολλο που περιγράφει τη λειτουργία του προσδιορισμού με ανταγωνιστές περιλαμβάνεται σε καθοδηγητικό έγγραφο (37). Η αναπαραγωγιμότητα και η ευαισθησία του προσδιορισμού στην περίπτωση των χημικών ουσιών με αμιγώς αντιοιστρογονική δράση θα καθοριστούν ακριβέστερα σε μεταγενέστερο στάδιο, αφού εφαρμοστεί η διαδικασία δοκιμής ως συνήθης πρακτική για αρκετό χρόνο και προσδιοριστούν περισσότερες χημικές ουσίες που δρουν με αυτόν τον τρόπο.
11. Αναγνωρίζεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν ζώα πρέπει να είναι σύμφωνες με τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των ζώων. Οι κατωτέρω περιγραφές φροντίδας και αγωγής αποτελούν ελάχιστα πρότυπα επιδόσεων και αντικαθίστανται από τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (38). Περαιτέρω καθοδήγηση για την ανώδυνη μεταχείριση των ζώων παρέχει ο ΟΟΣΑ (25).
12. Όπως σε όλους τους προσδιορισμούς για τους οποίους χρησιμοποιούνται ζωντανά ζώα, είναι απαραίτητο να διασφαλίζεται ότι τα δεδομένα είναι πραγματικά απαραίτητα πριν από την έναρξη του προσδιορισμού. Παραδείγματος χάριν, δύο περιπτώσεις στις οποίες ενδέχεται να απαιτούνται τα δεδομένα είναι:
 - η μεγάλη πιθανότητα έκθεσης (1ο επίπεδο του εννοιολογικού πλαισίου, προσάρτημα 2) ή οι ενδείξεις οιστρογονικότητας (2ο επίπεδο), για να διερευνηθεί αν οι επιδράσεις αυτές είναι δυνατόν να ανακύψουν *in vivo*.
 - οι επιδράσεις που υποδηλώνουν οιστρογονικότητα σε *in vivo* δοκιμές 4ου ή 5ου επιπέδου, για να τεκμηριωθεί ότι οι επιδράσεις σχετίζονται με οιστρογονικό μηχανισμό που δεν μπορεί να διαλευκανθεί με δοκιμή *in vitro*.
13. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

14. Η ευαισθησία του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού βασίζεται σε ένα σύστημα δοκιμών σε ζώα στο οποίο ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών δεν είναι λειτουργικός, με αποτέλεσμα χαμηλά ενδογενή επίπεδα κυκλοφορούντων οιστρογόνων. Με τον τρόπο αυτόν εξασφαλίζεται μικρό βάρος γραμμής βάσης της μήτρας και μέγιστο εύρος αντίδρασης στα χορηγούμενα οιστρογόνα. Δύο καταστάσεις ευαισθησίας των θηλυκών τρωκτικών στα οιστρογόνα πληρούν την απαίτηση αυτή:
- άνηβα θηλυκά ζώα μετά τον απογαλακτισμό και πριν από την ήβη και
 - νεαρά ενήλικα θηλυκά ζώα μετά από ωοθηκτομή, αφού δοθεί πρώτα επαρκής χρόνος στους ιστούς της μήτρας να υποχωρήσουν.
15. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση. Χορηγούνται κλιμακωτές δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε δύο τουλάχιστον ομάδες πειραματόζων αγωγής (βλ. παράγραφο 33 για καθοδήγηση), με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα και περίοδο χορήγησης τριών συνεχών ημερών στη μέθοδο με άνηβα ζώα, ενώ στη μέθοδο με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή, η ελάχιστη περίοδος χορήγησης είναι τρεις συνεχείς ημέρες. Τα ζώα νεκροτομούνται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Στην περίπτωση των αγωνιστών των οιστρογόνων, εξετάζεται το μέσο βάρος μήτρας στις ομάδες των ζώων που υποβάλλονται σε αγωγή σε σχέση με την ομάδα μαρτύρων με τον φορέα, για να διαπιστωθεί στατιστικά σημαντική αύξηση. Μια στατιστικά σημαντική αύξηση του μέσου βάρους μήτρας σε ομάδα δοκιμής υποδηλώνει θετική αντίδραση στον παρόντα βιοπροσδιορισμό.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή ζωικού είδους

16. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα στελέχη εργαστηριακών τρωκτικών που χρησιμοποιούνται συνήθως. Παραδείγματος χάριν, κατά την επικύρωση χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη επιμύων Sprague-Dawley και Wistar. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη τρωκτικών για τα οποία είναι γνωστό ή υπάρχουν υπόνοιες ότι η μήτρα τους ανταποκρίνεται λιγότερο. Το εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την ευαισθησία του χρησιμοποιούμενου στελέχους, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 26 και 27.
17. Η χρήση επιμύων και ποντικών στον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό αποτελεί συνήθη πρακτική από τη δεκαετία του '30. Οι μελέτες επικύρωσης του ΟΟΣΑ διεξήχθησαν μόνο με επίμυες, επειδή θεωρείται ότι τα δύο είδη αναμένεται να είναι ισοδύναμα και, επομένως, ένα είδος αρκεί για την παγκόσμια επικύρωση, ώστε να εξοικονομηθούν πόροι και ζώα. Ο επίμυς είναι το προτιμώμενο είδος στις περισσότερες μελέτες αναπαραγωγικής και αναπτυξιακής τοξικότητας. Λαμβανομένου υπόψη ότι υπάρχει μια τεράστια ιστορική βάση δεδομένων για τους ποντικούς και για να επεκταθεί το πεδίο εφαρμογής του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού σε τρωκτικά στη χρήση ποντικών ως ζωικού είδους δοκιμής, διεξήχθη περιορισμένη μελέτη επικύρωσης συνέχειας σε ποντικούς (16). Επιλέχθηκε προσέγγιση παρεκβολής με περιορισμένο αριθμό ελεγχόμενων χημικών ουσιών και συμμετεχόντων εργαστηρίων, χωρίς δοκιμές κωδικοποιημένων δειγμάτων, ώστε να διατηρηθεί η αρχική πρόθεση εξοικονόμησης πόρων και ζώων. Από την εν λόγω μελέτη επικύρωσης με προσέγγιση παρεκβολής προέκυψε ότι, όσον αφορά τον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό σε νεαρούς ενήλικους ποντικούς που έχουν υποστεί ωοθηκτομή, τα δεδομένα που λαμβάνονται με επίμυες και ποντικούς είναι ποιοτικά και ποσοτικά αντίστοιχα. Κατ' αυτόν τον τρόπο, όταν το αποτέλεσμα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι προκαταρκτικό δεδομένο σε μακροπρόθεσμη μελέτη, μπορούν να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα της ίδιου στελέχους και προέλευσης. Η προσέγγιση παρεκβολής περιορίστηκε στους ποντικούς που έχουν υποστεί ωοθηκτομή, ενώ για την επικύρωση του μοντέλου με άνηβα ζώα δεν προέκυψε ανθεκτικό σύνολο δεδομένων. Κατόπιν τούτου, το μοντέλο με άνηβα ζώα δεν λαμβάνεται υπόψη στο πλαίσιο της παρούσας μεθόδου δοκιμών.
18. Συνεπώς, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ποντικοί αντί των επιμύων. Η χρήση του είδους αυτού θα πρέπει να αιτιολογείται βάσει τοξικολογικών, φαρμακοκινητικών και/ή άλλων κριτηρίων. Ενδέχεται να απαιτούνται τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου για τους ποντικούς. Παραδείγματος χάριν, η κατανάλωση τροφής από τους ποντικούς ως προς το σωματικό τους βάρος είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους επίμυες και, επομένως, η περιεκτικότητα της τροφής σε φυτοοιστρογόνα θα πρέπει να είναι μικρότερη στην περίπτωση των ποντικών σε σύγκριση με τους επίμυες (9)(20)(22).

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

19. Όλες οι διαδικασίες θα πρέπει να είναι σύμφωνες με τα τοπικά πρότυπα φροντίδας των πειραματόζων. Οι παρούσες περιγραφές φροντίδας και αγωγής αποτελούν ελάχιστα πρότυπα και αντικαθίστανται από τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (38). Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζων θα πρέπει να είναι 22 °C (με εύρος ± 3 °C περίπου). Η σχετική υγρασία πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει μέγιστο ποσοστό 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή σχετικής υγρασίας 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός με ημερήσια φωτοπερίοδο 12 ωρών.
20. Το εργαστηριακό σιτηρέσιο και πόσιμο νερό θα πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Τα νεαρά ενήλικα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά ή σε κλωβούς σε ομάδες έως τριών ζώων. Λόγω του νεαρού της ηλικίας των άνηβων ζώων, συνιστάται η στέγαση σε κοινωνικές ομάδες.

21. Είναι γνωστό ότι τα υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων στα εργαστηριακά σιτηρέσια προκαλούν αύξηση του βάρους της μήτρας των τρωκτικών σε βαθμό που παρεμποδίζει τον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό (13)(14)(15). Τα υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων και μεταβολισμής ενέργειας στα εργαστηριακά σιτηρέσια είναι επίσης δυνατόν να προκαλέσουν πρόωρη ήβη, εάν χρησιμοποιούνται άνηθα ζώα. Η παρουσία φυτοοιστρογόνων είναι κυρίως αποτέλεσμα της ένταξης προϊόντων σόγιας και τριφυλλίου στα εργαστηριακά σιτηρέσια, ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι συγκεντρώσεις φυτοοιστρογόνων διαφέρουν μεταξύ των διαφόρων παρτίδων ενός τυπικού εργαστηριακού σιτηρεσίου (23). Το σωματικό βάρος αποτελεί σημαντική μεταβλητή, δεδομένου ότι η ποσότητα τροφής που καταναλώνεται σχετίζεται με αυτό. Επομένως, η πραγματική δόση φυτοοιστρογόνων που προσλαμβάνεται μέσω του ίδιου σιτηρεσίου μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών και ανάλογα με την ηλικία (9). Στην περίπτωση των άνηθων θηλυκών επιμύων, η κατανάλωση τροφής ως προς το σωματικό βάρος ενδέχεται να είναι περίπου διπλάσια σε σύγκριση με τους νεαρούς ενήλικες θηλυκούς επιμύες που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή. Στην περίπτωση των νεαρών ενήλικων ποντικών, η κατανάλωση τροφής ως προς το σωματικό βάρος ενδέχεται να είναι περίπου τετραπλάσια σε σύγκριση με τους νεαρούς ενήλικους θηλυκούς ποντικούς που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή.
22. Ωστόσο, τα αποτελέσματα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού (9)(17)(18)(19) δείχνουν ότι περιορισμένες ποσότητες φυτοοιστρογόνων προερχόμενων από την τροφή είναι αποδεκτές και δεν μειώνουν την ευαισθησία του. Γενικά, τα επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην τροφή δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν τα 350 μg ισοδυνάμων γενιστεΐνης ανά γραμμάριο εργαστηριακού σιτηρεσίου στην περίπτωση των άνηθων θηλυκών επιμύων Sprague Dawley και Wistar (6)(9). Τα σιτηρέσια αυτά αναμένεται να είναι επίσης κατάλληλα για τις δοκιμές σε νεαρούς ενήλικους επιμύες που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή, διότι η κατανάλωση τροφής ως προς το σωματικό βάρος είναι μικρότερη στα νεαρά ενήλικα ζώα σε σύγκριση με τα άνηθα. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ενήλικες ποντικοί που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή ή επίμυες περισσότερο ευαίσθητοι στα φυτοοιστρογόνα, πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αναλογικής μείωσης των επιπέδων φυτοοιστρογόνων στην τροφή (20). Επιπλέον, οι διαφορές μεταξύ των σιτηρεσίων όσον αφορά τη διαθέσιμη μεταβολισμής ενέργεια μπορούν να οδηγήσουν σε χρονική μετάθεση της εμφάνισης της ήβης (21)(22).
23. Πριν από τη μελέτη, απαιτείται προσεκτική επιλογή σιτηρεσίου χωρίς υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων [για καθοδήγηση, βλ. βιβλιογραφικές παραπομπές (6)(9)] ή μεταβολισμής ενέργειας που μπορούν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα (15)(17)(19)(22)(36). Η εξασφάλιση των κατάλληλων επιδόσεων του συστήματος δοκιμών που χρησιμοποιεί το εργαστήριο, όπως εξειδικεύεται στις παραγράφους 26 και 27, αποτελεί σημαντικό έλεγχο και των δύο αυτών παραγόντων. Ως ασφαλιστική δικλείδα που συνάδει με την ορθή εργαστηριακή πρακτική, θα πρέπει να λαμβάνεται αντιπροσωπευτικό δείγμα κάθε παρτίδας τροφής που χορηγείται κατά τη διάρκεια της μελέτης για το ενδεχόμενο ανάλυσης της περιεκτικότητας σε φυτοοιστρογόνα (π.χ. σε περίπτωση μεγάλου βάρους μήτρας στους μάρτυρες σε σύγκριση με ιστορικούς μάρτυρες ή ανεπαρκούς αντίδρασης στο οιστρογόνο αναφοράς, τη 17α-αιθινυλοιστραδιόλη). Θα πρέπει να αναλύονται γνωστά κλάσματα των δειγμάτων στο πλαίσιο της μελέτης ή να καταψύχονται στους -20°C ή να φυλάσσονται κατά τρόπο ώστε να αποφεύγεται η αποσύνθεση του δείγματος πριν από την ανάλυση.
24. Ορισμένα υλικά στρωμνής μπορεί να περιέχουν χημικά οιστρογόνα ή αντιοιστρογόνα που απαντούν στη φύση (π.χ. είναι γνωστό ότι η κορύνη του αραβοσίτου επηρεάζει την κυκλικότητα του οίστρου των επιμύων και φαίνεται να δρα ως αντιοιστρογόνο). Το επιλεγόμενο υλικό στρωμνής θα πρέπει να περιέχει ελάχιστα επίπεδα φυτοοιστρογόνων.

Προετοιμασία των ζώων

25. Πειραματόζωα που δεν εμφανίζουν ενδείξεις ασθένειας ή σωματικών ανωμαλιών κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής. Η διάταξη των κλωβών θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλωβών. Τα ζώα θα πρέπει να λαμβάνουν αποκλειστικό για το καθένα αναγνωριστικό. Κατά προτίμηση, τα άνηθα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε κλωβούς με τις μητέρες τους ή με ανάδοχες μητέρες έως τον απογαλακτισμό κατά την περίοδο εγκλιματισμού. Η περίοδος εγκλιματισμού πριν από την έναρξη της μελέτης θα πρέπει να είναι περίπου 5 ημέρες για τα νεαρά ενήλικα ζώα και για τα άνηθα ζώα που παραδίδονται μαζί με τις μητέρες τους ή με ανάδοχες μητέρες. Εάν τα άνηθα ζώα παραλαμβάνονται ως απογαλακτισμένα ζώα χωρίς μητέρες, ενδέχεται να απαιτείται συντομότερη περίοδος εγκλιματισμού, δεδομένου ότι η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να αρχίζει αμέσως μετά τον απογαλακτισμό (βλ. παράγραφο 29).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Έλεγχος της ικανότητας του εργαστηρίου

26. Για τον έλεγχο της ικανότητας του εργαστηρίου υπάρχουν δύο επιλογές:
- περιοδικός έλεγχος που βασίζεται σε μια αρχική βασική μελέτη θετικών μαρτύρων (βλ. παράγραφο 27). Τουλάχιστον ανά εξάμηνο και κάθε φορά που επέρχεται αλλαγή η οποία ενδέχεται να επηρεάσει τις επιδόσεις του προσδιορισμού (π.χ. νέα σύνθεση σιτηρεσίου, αλλαγή του προσωπικού που διενεργεί την ανατομή, αλλαγή του στελέχους ή του προμηθευτή των ζώων κ.λπ.), θα πρέπει να επαληθεύεται η ανταπόκριση του συστήματος δοκιμών (ζωικού μοντέλου) με τη χρήση κατάλληλης δόσης (βάσει της βασικής μελέτης θετικών μαρτύρων που περιγράφεται στην παράγραφο 27) ενός οιστρογόνου αναφοράς, της 17α-αιθινυλοιστραδιόλης (αριθ. CAS 57-63-6).
 - χρήση συντρεχόντων μαρτύρων, με την προσθήκη σε κάθε προσδιορισμό μιας ομάδας στην οποία χορηγείται κατάλληλη δόση του οιστρογόνου αναφοράς.

Εάν το σύστημα δεν ανταποκρίνεται όπως αναμένεται, οι πειραματικές συνθήκες θα πρέπει να εξεταστούν και να τροποποιηθούν αναλόγως. Συνιστάται να χρησιμοποιείται δόση του οιστρογόνου αναφοράς περίπου ίση με την αποτελεσματική δόση ED70 έως ED80, ανεξαρτήτως προσέγγισης.

27. **Βασική μελέτη θετικών μαρτύρων** — Προτού ένα εργαστήριο εκπονήσει για πρώτη φορά μελέτη βάσει της παρούσας μεθόδου δοκιμών, θα πρέπει να αποδεικνύει την ικανότητά του ελέγχοντας την ανταπόκριση του ζωικού μοντέλου, με προσδιορισμό της σχέσης δόσης-απόκρισης ενός οιστρογόνου αναφοράς, της 17α-αιθινυλοιστραδιόλης (αριθ. CAS 57-63-6) (EE), με τέσσερις τουλάχιστον δόσεις. Η απόκριση όσον αφορά το βάρος μήτρας συγκρίνεται με επίσημα ιστορικά δεδομένα [βλ. βιβλιογραφική παραπομπή (5)]. Εάν αυτή η βασική μελέτη θετικών μαρτύρων δεν αποδώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα, οι πειραματικές συνθήκες θα πρέπει να εξεταστούν και να τροποποιηθούν.

Αριθμός και κατάσταση των ζώων

28. Κάθε ομάδα αγωγής και μαρτύρων θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 6 ζώα (και για τα δύο πρωτόκολλα της μεθόδου — με άνηβα ζώα και με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή).

Ηλικία των άνηβων ζώων

29. Στην περίπτωση του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού με άνηβα ζώα, θα πρέπει να προσδιορίζεται η ημέρα γέννησης. Η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να αρχίζει σε αρκετά πρώιμο στάδιο ώστε να διασφαλίζεται ότι, στο τέλος της χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, δεν έχει συντελεστεί ακόμα η φυσιολογική αύξηση των ενδογενών οιστρογόνων που συνδέεται με την ήβη. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι τα πολύ νεαρά ζώα ενδέχεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα. Για τον καθορισμό της βέλτιστης ηλικίας, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη τα δικά του προϋπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την ωρίμαση.

Γενικά, η χορήγηση δόσεων σε επίμυες μπορεί να αρχίζει αμέσως μετά τον πρώιμο απογαλακτισμό κατά τη 18η μεταγεννητική ημέρα (η ημέρα γέννησης θεωρείται ως η μεταγεννητική ημέρα 0). Κατά προτίμηση, θα πρέπει να ολοκληρώνεται την 21η μεταγεννητική ημέρα και, σε κάθε περίπτωση, πριν από την 25η μεταγεννητική ημέρα, διότι, μετά από αυτήν, ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών καθίσταται λειτουργικός και τα ενδογενή επίπεδα οιστρογόνων είναι δυνατόν να αρχίσουν να αυξάνονται, με ταυτόχρονη αύξηση των μέσων τιμών βάρους γραμμής βάσης της μήτρας και αύξηση των τυπικών αποκλίσεων της ομάδας (2)(3)(10)(11)(12).

Διαδικασία ωοθηκτομής

30. Στην περίπτωση των θηλυκών επιμύων και ποντικών που υποβάλλονται σε ωοθηκτομή (ομάδες αγωγής και μαρτύρων), η ωοθηκτομή πρέπει να πραγματοποιείται μεταξύ της 6ης και της 8ης εβδομάδας ζωής. Στην περίπτωση των επιμύων, θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 14 ημέρες μεταξύ της ωοθηκτομής και της πρώτης ημέρας χορήγησης δόσεων, ώστε να δίνεται η δυνατότητα στη μήτρα να επανέλθει σε μια ελάχιστη, σταθερή γραμμική βάση. Στην περίπτωση των ποντικών, θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 7 ημέρες μεταξύ της ωοθηκτομής και της πρώτης ημέρας χορήγησης δόσεων. Δεδομένου ότι μικρές ποσότητες ωοθηκτικού ιστού αρκούν για να παραχθούν σημαντικά κυκλοφορούντα επίπεδα οιστρογόνων (3), τα ζώα θα πρέπει να ελέγχονται πριν από τη χρήση τους, μέσω παρατήρησης δειγμάτων επιθηλιακών κυττάρων από τον κόλπο για τουλάχιστον πέντε συνεχείς ημέρες (π.χ. 10η-14η ημέρα μετά την ωοθηκτομή, στην περίπτωση των επιμύων). Εάν τα ζώα παρουσιάζουν ενδείξεις έναρξης του οίστρου, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Επίσης, κατά τη νεκροψία, θα πρέπει να εξετάζονται τα στελέχη των ωοθηκών για να διαπιστωθεί τυχόν παρουσία ωοθηκτικού ιστού. Εάν διαπιστωθεί παρουσία ωοθηκτικού ιστού, τα ζώα δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν στους υπολογισμούς (3).
31. Η διαδικασία ωοθηκτομής αρχίζει με το ζώο σε πρηνή θέση, αφού προηγουμένως έχει αναισθητοποιηθεί καταλλήλως. Η τομή για τη διάνοιξη του πλαγιοραχιαίου κοιλιακού τοιχώματος θα πρέπει να πραγματοποιείται κατά μήκος περίπου 1 εκατοστού στο μέσο της απόστασης μεταξύ του κατώτερου ορίου των πλευρών και της λαγονίου ακρολοφίας και λίγα χιλιοστά πλαγίως του πλευρικού περιθωρίου του σφυϊκού μυός. Η ωοθήκη θα πρέπει να αφαιρείται από την κοιλιακή κοιλότητα πάνω σε άσηπτη επιφάνεια και να αποκόπτεται στη συμβολή σάλπιγγας και σώματος της μήτρας. Αφού επιβεβαιωθεί ότι δεν έχει προκληθεί μεγάλη αιμορραγία, κλείνεται το κοιλιακό τοίχωμα με ράμμα και το δέρμα με συνδετήρες ή κατάλληλο ράμμα. Τα σημεία απολίνωσης εμφανίζονται στο σχήμα 1. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλη μετεγχειρητική αναλγησία που συνιστάται από κτηνίατρο με πείρα στη φροντίδα τρωκτικών.

Σωματικό βάρος

32. Στη μέθοδο με τα ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή, το σωματικό βάρος δεν συσχετίζεται με το βάρος της μήτρας, επειδή το τελευταίο επηρεάζεται από ορμόνες όπως τα οιστρογόνα, αλλά όχι από τους αυξητικούς παράγοντες που ρυθμίζουν το μέγεθος του σώματος. Αντιθέτως, το σωματικό βάρος συνδέεται με το βάρος της μήτρας στο μοντέλο με τα άνηβα ζώα, καθώς το σώμα ωριμάζει (34). Επομένως, στην αρχή της μελέτης, οι διαφορές βάρους των ζώων που χρησιμοποιούνται στο μοντέλο με τα άνηβα ζώα δεν θα πρέπει να υπερβαίνουν το ± 20 % της μέσης τιμής βάρους. Αυτό

σημαίνει ότι το μέγεθος της γέννας θα πρέπει να τυποποιείται από τον εκτροφέα ώστε να εξασφαλίζεται ότι οι απόγονοι διαφορετικών μητέρων λαμβάνουν περίπου την ίδια τροφή. Τα ζώα θα πρέπει να εντάσσονται στις ομάδες (μαρτύρων και αγωγής) με τυχαιοποιημένη κατανομή βάρους, έτσι ώστε το μέσο σωματικό βάρος να μη διαφέρει στατιστικά μεταξύ των ομάδων. Θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή, στο μέτρο του εφικτού, της ένταξης ζώων από την ίδια γέννα στην ίδια ομάδα αγωγής, χωρίς αυτό να συνεπάγεται αύξηση του αριθμού των γεννών που θα χρησιμοποιηθούν για την έρευνα.

Δοσολογία

33. Για να διαπιστωθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να έχει οιστρογονική δράση *in vivo*, αρκούν συνήθως δύο ομάδες δόσης και μία ομάδα μαρτύρων. Επομένως, ο συγκεκριμένος σχεδιασμός προτιμάται για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν επιδιώκεται η χάραξη καμπύλης δόσης-απόκρισης ή η παρέκταση σε χαμηλότερα επίπεδα δόσης, χρειάζονται τουλάχιστον 3 ομάδες δόσης. Εάν απαιτούνται πληροφορίες πέραν του εντοπισμού οιστρογονικής δράσης (π.χ. εκτίμηση ισχύος), θα πρέπει να εξετάζονται διαφορετικά δοσολογικά σχήματα. Τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής, με εξαίρεση τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, η ομάδα μαρτύρων θα πρέπει να λαμβάνει την ίδια ποσότητα φορέα με αυτή που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής (ή τον μέγιστο όγκο που χρησιμοποιείται στις ομάδες αγωγής, εάν αυτός διαφέρει μεταξύ των ομάδων).
34. Στόχος στην περίπτωση του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι η επιλογή δόσεων που εξασφαλίζουν την επιβίωση των ζώων και δεν τους προκαλούν σημαντική τοξικότητα ή αγωνία μετά από τρεις συνεχείς ημέρες χορήγησης της χημικής ουσίας σε μέγιστη δόση 1 000 mg/kg/ημέρα. Όλα τα επίπεδα δόσης θα πρέπει να προτείνονται και να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη των διαθέσιμων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο)κινητική της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή συγγενών υλών. Για το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να λαμβάνονται πρώτα υπόψη η τιμή LD50 και/ή οι πληροφορίες σχετικά με την οξεία τοξικότητα, ώστε να αποφεύγονται ο θάνατος, η μεγάλη ταλαιπωρία ή η αγωνία των ζώων (24)(25)(26). Η ανώτατη δόση θα πρέπει να αντανακλά τη μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ). Είναι επίσης αποδεκτές οι μελέτες με επίπεδο δόσης που επάγει θετική μητροτροφική αντίδραση. Ως κριτήριο διαλογής είναι γενικά αποδεκτά τα μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων (π.χ. μία ημιλογαριθμική μονάδα — που αντιστοιχεί σε ακολουθία δόσεων με λόγο 3,2 — ή ακόμη και μία λογαριθμική μονάδα). Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα, είναι δυνατόν να διεξαχθεί μελέτη καθορισμού εύρους για τη διευκόλυνση του προσδιορισμού των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν.
35. Εναλλακτικά, εάν η οιστρογονική ισχύς ενός αγωνιστή μπορεί να εκτιμηθεί από δεδομένα *in vitro* (ή *in silico*), τα δεδομένα αυτά επιτρέπεται να λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή των δόσεων. Παραδείγματος χάριν, η ποσότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας που θα προκαλούσε μητροτροφικές αντιδράσεις ισοδύναμες του αγωνιστή αναφοράς (αιθινυλοιστραδιόλη) εκτιμάται μέσω της *in vitro* ισχύος της σε σχέση με την αιθινυλοιστραδιόλη. Η ανώτατη δόση δοκιμής προκύπτει με πολλαπλασιασμό αυτής της ισοδύναμης δόσης επί κατάλληλο συντελεστή, π.χ. 10 ή 100.

Ζητήματα σχετικά με τον καθορισμό εύρους

36. Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να διεξαχθεί προκαταρκτική μελέτη καθορισμού εύρους με λίγα ζώα. Για τη μελέτη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί το καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 19 του ΟΟΣΑ (25) που ορίζει τα κλινικά σημεία τοξικότητας ή αγωνίας στα ζώα. Εάν είναι εφικτό στο πλαίσιο της εν λόγω μελέτης καθορισμού εύρους, μετά από τρεις ημέρες χορήγησης δόσεων η μήτρα εκτένεται και ζυγίζεται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Τα δεδομένα αυτά μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν ως βοήθημα κατά τον σχεδιασμό της κυρίως μελέτης (επιλογή αποδεκτής μέγιστης δόσης και αποδεκτών χαμηλότερων δόσεων, καθώς και του συνιστώμενου αριθμού ομάδων δόσης).

Χορήγηση δόσεων

37. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση. Κατά την επιλογή οδού χορήγησης θα πρέπει να συνεκτιμώνται παράμετροι καλής μεταχείρισης των ζώων, καθώς και οι τοξικολογικές πτυχές, όπως η συνάφεια με την οδό έκθεσης του ανθρώπου στη χημική ουσία (π.χ. στομαχικός καθετήρας για έκθεση μέσω κατάποσης, υποδόρια ένεση για έκθεση μέσω της εισπνοής ή της επιδερμίδας), οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης ύλης και, ιδίως, τα υφιστάμενα τοξικολογικά στοιχεία και δεδομένα για τον μεταβολισμό και την κινητική (π.χ. ανάγκη αποφυγής του μεταβολισμού πρώτης διόδου, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μέσω συγκεκριμένης οδού).
38. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος. Δεδομένου όμως ότι οι περισσότεροι συνδότες οιστρογόνων ή οι μεταβολικοί πρόδρομοι αυτών είναι συνήθως υδρόφοβοι, η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο, φιστικέλαιο, σησαμέλαιο ή ελαιόλαδο) αποτελεί τη συνηθέστερη προσέγγιση. Ωστόσο, τα έλαια αυτά έχουν διαφορετική περιεκτικότητα σε θερμίδες και λίπη και, ως εκ τούτου, ο φορέας ενδέχεται να επηρεάζει τη συνολική πρόσληψη μεταβολισμής ενέργειας, μεταβάλλοντας με τον τρόπο αυτό τα μετρούμενα τελικά σημεία, όπως το βάρος της μήτρας, ιδίως στη μέθοδο με τα άνηθα ζώα (33). Συνεπώς, πριν από τη μελέτη θα πρέπει να ελέγχεται οποιοσδήποτε φορέας πρόκειται να χρησιμοποιηθεί έναντι μαρτύρων χωρίς φορέα. Οι ελεγχόμενες

χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε ελάχιστη ποσότητα αιθανόλης 95 % ή άλλου κατάλληλου διαλύτη και τα διαλύματά τους να αραιώνονται στον φορέα της δοκιμής μέχρι τις τελικές συγκεντρώσεις εργασίας. Τα τοξικά χαρακτηριστικά του διαλύτη πρέπει να είναι γνωστά και να ελέγχονται σε χωριστή ομάδα μαρτύρων στην οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται σταθερή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ήπια θέρμανση και έντονη μηχανική δράση για τη διευκόλυνση της διάλυσής της. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα. Εάν η ουσία είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, είναι δυνατόν να παρασκευάζεται ένα αρχικό γνωστό κλάσμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και οι καθοριζόμενες αραιώσεις δοσολογίας να ετοιμάζονται καθημερινά.

39. Οι χρόνοι χορήγησης των δόσεων εξαρτώνται από το χρησιμοποιούμενο μοντέλο (βλ. παράγραφο 29 για το μοντέλο με άνηβα ζώα και παράγραφο 30 για το μοντέλο με ενήλικα ζώα που έχουν υποστεί ωθηκτομή). Στους άνηβους θηλυκούς επίμους χορηγείται η ελεγχόμενη χημική ουσία καθημερινά για τρεις συνεχόμενες ημέρες. Αγωγή τριών ημερών συνιστάται επίσης για θηλυκούς επίμους που έχουν υποστεί ωθηκτομή, αλλά είναι αποδεκτές και μεγαλύτερες περιόδους έκθεσης, οι οποίες ενδέχεται να βελτιώνουν την ανίχνευση ασθενώς δραστικών χημικών ουσιών. Στην περίπτωση των θηλυκών ποντικών που έχουν υποστεί ωθηκτομή, η χορήγηση δόσεων επί 3 ημέρες κανονικά επαρκεί, χωρίς να προκύπτει σημαντικό πλεονέκτημα από την παράταση της αγωγής έως και επτά ημέρες για ισχυρούς αγωνιστές οιστρογόνων. Ωστόσο, επειδή η σχέση αυτή δεν καταδείχθηκε για ασθενή οιστρογόνα στη μελέτη επικύρωσης (16), η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να παρατείνεται για έως 7 συνεχείς ημέρες στην περίπτωση των ενήλικων ποντικών που έχουν υποστεί ωθηκτομή. Οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα και να ρυθμίζονται όπως είναι απαραίτητο, ώστε να διατηρείται σταθερό επίπεδο δόσης σε σχέση με το σωματικό βάρος του ζώου (π.χ. mg ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά kg σωματικού βάρους ανά ημέρα). Όσον αφορά τον όγκο δοκιμής, η μεταβλητότητά του βάσει του σωματικού βάρους πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης του διαλύματος δόσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε σχέση με το σωματικό βάρος σε όλα τα επίπεδα δόσης και για κάθε οδό χορήγησης.
40. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται από το στόμα, θα πρέπει να χορηγείται σε εφάπαξ ημερήσια δόση, με τη βοήθεια στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εφάπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Θα πρέπει να εφαρμόζονται οι τοπικές κατευθυντήριες γραμμές για τη φροντίδα των ζώων, αλλά ο όγκος να μην υπερβαίνει τα 5 ml/kg σωματικού βάρους, με εξαίρεση τα υδατικά διαλύματα, στην περίπτωση των οποίων μπορούν να χρησιμοποιούνται 10 ml/kg σωματικού βάρους.
41. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με υποδόρια ένεση, θα πρέπει να χορηγείται με εφάπαξ ημερήσια δόση. Οι ενέσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται στη ραχιαία περιοχή της ωμοπλάτης ή την οσφυϊκή περιοχή με αποστειρωμένη βελόνα (π.χ. διαμετρήματος 23 ή 25) και σύριγγα φυματινής. Το ξύρισμα του σημείου της ένεσης είναι προαιρετικό. Θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν απώλειες, διαρροή στο σημείο της ένεσης ή ελλιπής χορήγηση της δόσης. Ο συνολικός όγκος ένεσης ανά επίμου ανά ημέρα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 ml/kg σωματικού βάρους, διαιρούμενος σε 2 σημεία ένεσης, με εξαίρεση τα υδατικά διαλύματα, στην περίπτωση των οποίων μπορούν να χρησιμοποιούνται 10 ml/kg σωματικού βάρους.

Παρατηρήσεις

Γενικές κλινικές παρατηρήσεις

42. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μία φορά ημερησίως και συχνότερα όταν εμφανίζονται σημεία τοξικότητας. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση την(τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου των αναμενόμενων μέγιστων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Πρέπει να παρατηρούνται όλα τα ζώα για θνησιμότητα, νοσηρότητα και γενικά κλινικά σημεία, όπως αλλαγές στη συμπεριφορά, το δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση των τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής).

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής

43. Όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται καθημερινά με ακρίβεια 0,1 g, για πρώτη φορά ακριβώς πριν από την έναρξη της αγωγής, δηλ. όταν κατανέμονται στις ομάδες. Προαιρετικά, μπορεί να μετράται η ποσότητα τροφής που καταναλώνεται κατά την περίοδο αγωγής ανά κλωβό, με ζύγιση των διατάξεων τροφοδοσίας. Τα αποτελέσματα που αφορούν την κατανάλωση τροφής θα πρέπει να εκφράζονται σε γραμμάρια ανά επίμου ανά ημέρα.

Ανατομή και μέτρηση του βάρους της μήτρας

44. Οι επίμους θανατώνονται ανώδυνα 24 ώρες μετά την τελευταία αγωγή. Σε ιδανικές συνθήκες, η σειρά νεκρωσίας τυχαioποιείται μεταξύ των ομάδων ώστε να αποφεύγεται η πρόοδος κατά τη σειρά των ομάδων δόσης, ανοδικά ή καθοδικά, που θα μπορούσε να επηρεάσει ελαφρώς τα δεδομένα. Στόχος του βιοπροσδιορισμού είναι η μέτρηση του βάρους της μήτρας σε υγρή και σε στυπωμένη κατάσταση. Το βάρος σε υγρή κατάσταση περιλαμβάνει τη μήτρα και το υγρό του αυλού. Το βάρος σε στυπωμένη κατάσταση μετράται αφού εκφραστεί και αφαιρεθεί το περιεχόμενο του αυλού της μήτρας.

45. Πριν από την ανατομή, εξετάζεται ο κόλπος των άνηβων ζώων για να διαπιστωθεί αν υπάρχει άνοιγμα. Η διαδικασία ανατομής αρχίζει με διάνοιξη του κοιλιακού τοιχώματος με αφετηρία την ηβική σύμφυση. Στη συνέχεια, το κέρασ της μήτρας και οι ωοθήκες, εάν υπάρχουν, αποσπώνται από το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Η ουροδόχος κύστη και οι ουρητήρες απομακρύνονται από την πρόσθια και την πλάγια πλευρά της μήτρας και του κόλπου. Αποκολλάται η ινώδης σύμφυση μεταξύ του ορθού και του κόλπου έως ότου να μπορεί να εντοπιστεί η συμβολή στομίου του κόλπου και δέρματος του περινέου. Η μήτρα και ο κόλπος αποσπώνται από το σώμα με τομή στο τοίχωμα του κόλπου ακριβώς πάνω από τη συμβολή με το δέρμα του περινέου, όπως εμφανίζεται στο σχήμα 2. Η μήτρα θα πρέπει να αποσπάται από το τοίχωμα του σώματος με προσεκτική τομή του μεσεντερίου της στο σημείο πρόσφυσής του σε όλο το μήκος της πλαγιόραχιαίας όψης κάθε κέρατος. Μετά την αφαίρεση της μήτρας από το σώμα, απαιτούνται αρκετά ταχείς χειρισμοί για να μην ξηρανθούν οι ιστοί. Η απώλεια βάρους λόγω ξήρανσης αποκτά μεγαλύτερη σημασία στην περίπτωση μικρών ιστών, όπως η μήτρα (23). Εάν υπάρχουν οι ωοθήκες, αφαιρούνται στη σάλπιγγα, με μέριμνα ώστε να μην υπάρξει απώλεια υγρού του αυλού από το κέρασ της μήτρας. Εάν το ζώο έχει υποβληθεί σε ωοθηκτομή, θα πρέπει να εξετάζονται τα στελέχη για τυχόν παρουσία ωοθηκικού ιστού. Η περίσσεια λίπους και οι συνδετικοί ιστοί θα πρέπει να περικόπτονται. Ο κόλπος αφαιρείται από τη μήτρα ακριβώς κάτω από τον τράχηλο, ώστε αυτός να παραμείνει μαζί με το σώμα της μήτρας, όπως εμφανίζεται στο σχήμα 2.
46. Κάθε μήτρα θα πρέπει να μεταφέρεται σε σκεύος που φέρει αποκλειστική σήμανση και έχει ζυγιστεί (π.χ. τρυβλίο Petri ή πλαστικό σκαφίδιο ζύγισης), με αμείωτη μέριμνα για την αποφυγή της ξήρανσης πριν από τη ζύγιση (π.χ. στο σκεύος μπορεί να τοποθετηθεί διηθητικό χαρτί ελαφρώς εμποτισμένο με φυσιολογικό ορό). Η μήτρα με το υγρό του αυλού ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg (βάρος μήτρας σε υγρή κατάσταση).
47. Στη συνέχεια, κάθε μήτρα υποβάλλεται χωριστά σε επεξεργασία για την απομάκρυνση του υγρού του αυλού. Τα δύο κέρατα της μήτρας διατρύπώνται ή τέμνονται κατά μήκος. Η μήτρα τοποθετείται σε ελαφρώς βρεγμένο διηθητικό χαρτί (π.χ. Whatman No. 3) και πιέζεται απαλά με ένα δεύτερο, ελαφρώς βρεγμένο διηθητικό χαρτί ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το υγρό του αυλού. Η μήτρα, χωρίς το περιεχόμενο του αυλού, ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg (βάρος μήτρας σε στενωμένη κατάσταση).
48. Το βάρος της μήτρας κατά τη λήξη της μελέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι δεν σημειώνεται υπέρβαση της κατάλληλης ηλικίας των άνηβων άθικτων επιμύων. Ωστόσο, καθοριστικής σημασίας είναι εν προκειμένω τα ιστορικά δεδομένα για το στέλεχος επιμύων που χρησιμοποιεί το εργαστήριο (για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων βλ. παράγραφο 56).

Προαιρετικές έρευνες

49. Μετά τη ζύγιση, η μήτρα μπορεί να μονιμοποιηθεί σε ουδέτερη φορμόλη 10 % με ρυθμιστικό διάλυμα, για ιστοπαθολογική εξέταση με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης. Ο κόλπος μπορεί να εξεταστεί αντιστοίχως (βλ. παράγραφο 9). Επιπλέον, είναι δυνατή η μορφομετρική μέτρηση των επιθηλίων του ενδομητρίου για ποσοτική σύγκριση.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

50. Τα δεδομένα της μελέτης θα πρέπει να περιλαμβάνουν:
- τον αριθμό των ζώων στην αρχή του προσδιορισμού,
 - τον αριθμό και την ταυτότητα των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τον προσδιορισμό ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν και την ημερομηνία και ώρα θανάτου ή θανάτωσης με ανώδυνο τρόπο,
 - τον αριθμό και την ταυτότητα των ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας και περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας και της σοβαρότητας των τοξικών επιδράσεων, και
 - τον αριθμό και την ταυτότητα των ζώων που εμφάνισαν αλλοιώσεις και περιγραφή του είδους των αλλοιώσεων.
51. Θα πρέπει να καταγράφονται ατομικά δεδομένα για το σωματικό βάρος των ζώων και το βάρος της μήτρας τους σε υγρή και σε στενωμένη κατάσταση. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μονόπλευρες στατιστικές αναλύσεις για τους αγωνιστές, ώστε να διαπιστώνεται αν η χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) αύξηση του βάρους της μήτρας. Θα πρέπει να διενεργούνται κατάλληλες στατιστικές αναλύσεις για τον έλεγχο των σχετιζόμενων με την αγωγή μεταβολών του βάρους της μήτρας σε υγρή και σε στενωμένη κατάσταση. Παραδείγματος χάριν, τα δεδομένα μπορούν να αξιολογούνται με προσέγγιση ανάλυσης της συνδιακύμανσης (ANCOVA), κατά την οποία χρησιμοποιείται ως συμμεταβλητή το σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία. Τα δεδομένα για τη μήτρα μπορούν να υποβάλλονται σε λογαριθμικό μετασχηματισμό σταθεροποίησης της διασποράς πριν από την ανάλυσή τους. Η δοκιμασία Dunnett και Hsu είναι κατάλληλη για τη σύγκριση κατά ζεύγη των ομάδων δόσης με την ομάδα μαρτύρων

με τον φορέα και για τον υπολογισμό των διαστημάτων εμπιστοσύνης. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τυποποιημένα υπόλοιπα Student (studentized) για τον εντοπισμό ενδεχόμενων ακραίων τιμών και την αξιολόγηση της ομοιογένειας της διασποράς. Οι διαδικασίες αυτές εφαρμόστηκαν στο πρόγραμμα επικύρωσης του ΟΟΣΑ με τη χρήση του PROC GLM στο σύστημα στατιστικής ανάλυσης (SAS Institute, Cary, NC), έκδοση 8 (6)(7).

52. Η τελική έκθεση περιλαμβάνει τα εξής:

Εγκαταστάσεις δοκιμών:

- υπεύθυνο προσωπικό και οι αρμοδιότητές του στη μελέτη·
- δεδομένα από τη βασική δοκιμή θετικών μαρτύρων και περιοδικά δεδομένα θετικών μαρτύρων (βλ. παραγράφους 26 και 27).

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

- χαρακτηρισμός των ελεγχόμενων χημικών ουσιών·
- φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες·
- μέθοδος και συχνότητα αραιώσεων·
- τυχόν δεδομένα που προέκυψαν σχετικά με τη σταθερότητα·
- τυχόν αναλύσεις των διαλυμάτων δόσεων.

Φορέας:

- χαρακτηρισμός του φορέα της δοκιμής (είδος, προμηθευτής και παρτίδα)·
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Πειραματόζωα:

- είδος και στέλεχος και αιτιολόγηση της επιλογής τους·
- προμηθευτής και συγκεκριμένες εγκαταστάσεις του προμηθευτή·
- ηλικία κατά την προμήθεια με ημερομηνία γέννησης·
- στην περίπτωση των άνηθων ζώων, το κατά πόσον παραδόθηκαν με τις μητέρες ή με ανάδοχες μητέρες και ημερομηνία απογαλακτισμού·
- λεπτομέρειες σχετικά με τη διαδικασία εγκλιματισμού των ζώων·
- αριθμός ζώων ανά κλωβό·
- λεπτομέρειες και μέθοδος ταυτοποίησης κάθε ζώου και ομάδας.

Συνθήκες προσδιορισμού:

- λεπτομέρειες για τη διαδικασία τυχαιοποίησης (δηλ. χρησιμοποιηθείσα μέθοδος)·
- αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων·
- λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις, τη σταθερότητα και την ομοιογένειά του·
- λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και αιτιολόγηση της επιλογής της οδού έκθεσης·
- τροφή (όνομα, τύπος, προμηθευτής, περιεχόμενο και επίπεδα φυτοοιστρογόνων, εάν είναι γνωστά)·
- πηγή νερού (π.χ. νερό βρύσης ή φιλτραρισμένο) και παροχή (με σωλήνα από μεγάλο δοχείο, σε φιάλες κλπ.)·
- στρωμένη (όνομα, τύπος, προμηθευτής, περιεχόμενο)·
- καταγραφή των συνθηκών στέγασης στους κλωβούς, της φωτοπερίοδου, της θερμοκρασίας και υγρασίας της αίθουσας, του καθαρισμού της αίθουσας·
- λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών νεκροψίας και ζύγισης της μήτρας·
- περιγραφή των στατιστικών διαδικασιών.

Αποτελέσματα**Για κάθε ζώο χωριστά:**

- όλες οι ημερήσιες τιμές σωματικού βάρους (από την κατανομή στις ομάδες έως και τη νεκροψία) (με ακρίβεια 0,1 g)
- ηλικία κάθε ζώου (σε ημέρες, με την ημερομηνία γέννησης θεωρούμενη ως ημέρα 0) κατά την έναρξη της χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας
- ημερομηνία και ώρα χορήγησης κάθε δόσης
- υπολογισθείς όγκος και δοσολογία που χορηγήθηκε και τυχόν παρατηρηθείσες απώλειες δοσολογίας κατά τη χορήγηση ή μετά από αυτή
- καθημερινή καταγραφή της κατάστασης του ζώου, συμπεριλαμβανομένων των σχετικών συμπτωμάτων και παρατηρήσεων
- πιθανή αιτία θανάτου (εάν το ζώο βρέθηκε νεκρό ή ετοιμοθάνατο κατά τη διάρκεια της μελέτης)
- ημερομηνία και ώρα ανώδυνης θανάτωσης και χρονικό διάστημα έως την τελευταία δόση
- βάρος μήτρας σε υγρή κατάσταση (με ακρίβεια 0,1 mg) και τυχόν παρατηρηθείσες απώλειες υγρού του αυλού κατά την ανατομή και την προετοιμασία για ζύγιση
- βάρος της μήτρας σε στυπωμένη κατάσταση (με ακρίβεια 0,1 mg).

Για κάθε ομάδα ζώων:

- μέσες ημερήσιες τιμές σωματικού βάρους (με ακρίβεια 0,1 g) και τυπικές αποκλίσεις (από την κατανομή στις ομάδες έως τη νεκροψία)
- μέσες τιμές βάρους μήτρας σε υγρή κατάσταση και σε στυπωμένη κατάσταση (με ακρίβεια 0,1 mg) και τυπικές αποκλίσεις
- εάν μετράται, ημερήσια κατανάλωση τροφής (υπολογιζόμενη σε γραμμάρια καταναλωθείσας τροφής ανά ζώο)
- τα αποτελέσματα των στατιστικών αναλύσεων με τις οποίες συγκρίθηκε το βάρος μήτρας, σε υγρή και σε στυπωμένη κατάσταση, στις ομάδες αγωγής με τις αντίστοιχες τιμές στις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα.
- τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης με την οποία συγκρίθηκε το συνολικό σωματικό βάρος και η αύξησή του στις ομάδες αγωγής με τις αντίστοιχες τιμές στις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα.

53. Σύνοψη των βασικών καθοδηγητικών στοιχείων της μεθόδου δοκιμών

	Επίμυς	Ποντικός
Ζώα		
Στέλεχος	Συνήθως χρησιμοποιούμενο στέλεχος εργαστηριακών τρωκτικών	
Αριθμός ζώων	Τουλάχιστον 6 ζώα ανά ομάδα δόσης	
Αριθμός ομάδων	Τουλάχιστον 2 ομάδες δοκιμής (βλ. παράγραφο 33 για οδηγίες) και μια ομάδα αρνητικών μαρτύρων Για οδηγίες σχετικά με τις ομάδες θετικών μαρτύρων, βλ. παραγράφους 26 και 27	
Συνθήκες στέγασης και διατροφής		
Θερμοκρασία στην αίθουσα των ζώων	22 °C ± 3 °C	
Σχετική υγρασία	50-60 % και όχι κάτω του 30 % ή άνω του 70 %	
Φωτοπερίοδος	12 ώρες φωτός, 12 ώρες σκότους	
Τροφή και πόσιμο νερό	Κατά βούληση	

	Επίμυς	Ποντικός
Στέγαση	Ατομική ή σε ομάδες έως τριών ζώων (συνιστάται η στέγαση των άνηβων ζώων σε κοινωνικές ομάδες)	
Τροφή και στρωμή	Συνιστώνται χαμηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην τροφή και τη στρωμή.	
Πρωτόκολλο		
Μέθοδος	Μέθοδος με άνηβα ζώα που δεν έχουν υποστεί ωοθηκτομή (προτιμώμενη μέθοδος) Μέθοδος με ενήλικα θηλυκά ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή	Μέθοδος με ενήλικα θηλυκά ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή
Ηλικία χορήγησης δόσεων στα άνηβα ζώα	18η ΜΓΗ ή μεγαλύτερη ηλικία. Η χορήγηση δόσεων θα πρέπει να ολοκληρώνεται πριν από την 25η ΜΓΗ.	Δεν εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της παρούσας μεθόδου δοκιμών.
Ηλικία ωοθηκτομής	Μεταξύ της 6ης και της 8ης εβδομάδας ζωής	
Ηλικία χορήγησης δόσεων σε ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή	Θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 14 ημέρες μεταξύ της ωοθηκτομής και της 1ης ημέρας χορήγησης των δόσεων.	Θα πρέπει να μεσολαβούν τουλάχιστον 7 ημέρες μεταξύ της ωοθηκτομής και της 1ης ημέρας χορήγησης των δόσεων.
Σωματικό βάρος	Η μεταβολή του σωματικού βάρους θα πρέπει να είναι ελάχιστη και να μην υπερβαίνει το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους.	
Χορήγηση δόσεων		
Οδός χορήγησης	Στομαχικός καθετήρας ή υποδόρια ένεση	
Συχνότητα χορήγησης	Εφάπαξ ημερήσια δόση	
Όγκος για τον στομαχικό καθετήρα και την ένεση	$\leq 5\text{ml/kg}$ σωματικού βάρους (ή έως 10ml/kg σωματικού βάρους στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων) (σε 2 σημεία ένεσης στην περίπτωση της υποδόριας ένεσης)	
Διάρκεια χορήγησης	3 συνεχείς ημέρες στο μοντέλο με τα άνηβα ζώα Τουλάχιστον 3 συνεχείς ημέρες στο μοντέλο με τα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή	7 συνεχείς ημέρες στο μοντέλο με τα ζώα που έχουν υποστεί ωοθηκτομή
Χρόνος νεκροψίας	Περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση	
Αποτελέσματα		
Θετική αντίδραση	Στατιστικά σημαντική αύξηση του μέσου βάρους της μήτρας (σε υγρή και/ή στυπωμένη κατάσταση)	
Οιστρογόνο αναφοράς	17α-αιθινυλοιστραδιόλη	

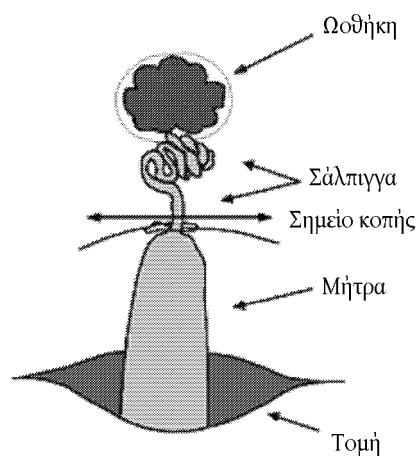
ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΑΠΟΔΟΧΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

54. Γενικά, μια δοκιμή οιστρογονικότητας θα πρέπει να θεωρείται θετική εάν προκύπτει στατιστικά σημαντική αύξηση του βάρους της μήτρας ($p < 0,05$) τουλάχιστον στο υψηλό επίπεδο δόσης σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων με τον διαλύτη. Το θετικό αποτέλεσμα ενισχύεται περαιτέρω από την απόδειξη βιολογικά ευλογοφανούς σχέσης μεταξύ της δόσης και του μεγέθους της απόκρισης, χωρίς ωστόσο να παραβλέπεται ότι οι αλληλεπικαλυπτόμενες οιστρογονικές και αντιοιστρογονικές δράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ενδέχεται να επηρεάσουν το σχήμα της καμπύλης δόσης-απόκρισης.
55. Για να είναι δυνατή η ουσιαστική ερμηνεία των δεδομένων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη γίνεται υπέρβαση της μέγιστης ανεκτής δόσης. Εν προκειμένω, θα πρέπει να αξιολογούνται ενδελεχώς η μείωση του σωματικού βάρους, τα κλινικά σημεία και τα λοιπά ευρήματα.

56. Σημαντική παράμετρος για την αποδοχή των δεδομένων του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού είναι το βάρος της μήτρας στην ομάδα των μαρτύρων με τον ο φορέας. Οι υψηλές τιμές στους μάρτυρες είναι δυνατόν να εκθέσουν σε κίνδυνο την ανταπόκριση του βιοπροσδιορισμού και την ικανότητα ανίχνευσης πολύ ασθενών αγωνιστών των οιστρογόνων. Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας και τα δεδομένα που συγκεντρώθηκαν κατά την επικύρωση του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού δείχνουν ότι, πράγματι, εμφανίζονται φυσικές υψηλές μέσες τιμές στους μάρτυρες, ιδίως στην περίπτωση των άνηβων ζώων (2)(3)(6)(9). Δεδομένου ότι το βάρος της μήτρας των άνηβων επιμύων εξαρτάται από πολλές μεταβλητές, όπως το στέλεχος ή το σωματικό βάρος, δεν μπορεί να καθοριστεί οριστικό ανώτατο όριο βάρους της μήτρας. Γενικά, εάν το βάρος της μήτρας των άνηβων επιμύων, σε συπλωμένη κατάσταση, στην ομάδα των μαρτύρων κυμαίνεται από 40 έως 45 mg, τα αποτελέσματα θα πρέπει να θεωρούνται ύποπτα, ενώ με τιμές βάρους μήτρας άνω των 45 mg ενδέχεται να πρέπει να επαναληφθεί η δοκιμή. Ωστόσο, το ενδεχόμενο αυτό θα πρέπει να εξετάζεται κατά περίπτωση (3)(6)(8). Κατά την υποβολή ενήλικων επιμύων σε δοκιμή, εάν η ωθηκεκτομή είναι ατελής, παραμένει ωθηκικός ιστός που μπορεί να παράγει ενδογενή οιστρογόνα και να καθυστερήσει την υποχώρηση του βάρους της μήτρας.
57. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται όταν το βάρος μήτρας στην ομάδα μαρτύρων με τον φορέα είναι, σε συπλωμένη κατάσταση, μικρότερο από 0,09 % του σωματικού βάρους, στην περίπτωση των άνηβων θηλυκών επιμύων, και μικρότερο από 0,04 % του σωματικού βάρους, στην περίπτωση των νεαρών ενήλικων θηλυκών ζώων που έχουν υποστεί ωθηκεκτομή, φαίνεται ότι είναι αποδεκτά [βλ. πίνακα 31 (2)]. Εάν το βάρος της μήτρας των μαρτύρων υπερβαίνει τα ποσοστά αυτά, θα πρέπει να ελέγχονται σχολαστικά διάφοροι παράγοντες, μεταξύ των οποίων η ηλικία των ζώων, η άρτια ωθηκεκτομή, τα επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην τροφή και ούτω καθεξής, και τυχόν αρνητικό αποτέλεσμα του προσδιορισμού (καμία ένδειξη οιστρογονικής δράσης) θα πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή.
58. Το εργαστήριο θα πρέπει να διατηρεί ιστορικά δεδομένα, αφενός για τις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα και, αφετέρου, για τις αντιδράσεις σε θετικά οιστρογόνα αναφοράς, όπως η 17α-αιθινυλοιστραδιόλη. Τα εργαστήρια μπορούν επίσης να ελέγχουν την αντίδραση σε γνωστούς ασθενείς αγωνιστές οιστρογόνων. Όλα αυτά τα δεδομένα μπορούν να συγκρίνονται με τα διαθέσιμα δεδομένα (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) ώστε να διασφαλίζεται ότι οι μέθοδοι του εργαστηρίου παρέχουν επαρκή ευαισθησία.
59. Οι τιμές βάρους μήτρας σε συπλωμένη κατάσταση παρουσίασαν μικρότερη μεταβλητότητα κατά τη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης του ΟΟΣΑ σε σύγκριση με τις τιμές βάρους μήτρας σε υγρή κατάσταση (6)(7). Ωστόσο, μια σημαντική αντίδραση που διαπιστώνεται με οποιαδήποτε από τις δύο μετρήσεις υποδηλώνει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι θετική όσον αφορά την οιστρογονική δράση.
60. Η μητροτροφική αντίδραση δεν οφείλεται αποκλειστικά στα οιστρογόνα. Ωστόσο, το θετικό αποτέλεσμα του μητροτροφικού βιοπροσδιορισμού θα πρέπει να ερμηνεύεται γενικά ως απόδειξη οιστρογονικού δυναμικού *in vivo* και, κατά κανόνα, να αποτελεί το έναυσμα για ενέργειες με σκοπό την περαιτέρω διασαφήνιση (βλ. παράγραφο 9 και “Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών”, παράρτημα 2).

Σχήμα 1

Διάγραμμα που απεικονίζει τη χειρουργική αφαίρεση των ωθηκών



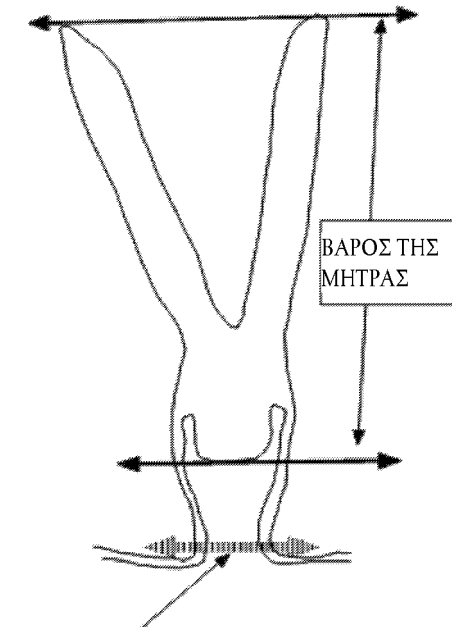
Το μεσομήτριο, το αγγειακό σύστημα και το λιπώδες στρώμα δεν απεικονίζονται.

Η διαδικασία αρχίζει με διάνοιξη του πλαγιοραχιαίου κοιλιακού τοιχώματος στο μέσο της απόστασης μεταξύ του κατώτερου ορίου των πλευρών και της λαγονίου ακρολοφίας και λίγα χιλιοστά πλαγίως του πλευρικού περιθωρίου του σπυϊκού μύος. Εντοπίζονται οι ωθήκες στην κοιλιακή κοιλότητα. Στη συνέχεια, οι ωθηκές αφαιρούνται με φυσικό

τρόπο από την κοιλιακή κοιλότητα πάνω σε αποστειρωμένη επιφάνεια: γίνεται απολίνωση μεταξύ της ωθήκης και της μήτρας για τον έλεγχο της αιμορραγίας και οι ωθήκες αποσπώνται με τομή πάνω από την απολίνωση, στη συμβολή σάλπιγγας και κέρατος της μήτρας. Αφού επιβεβαιωθεί η απουσία σημαντικής αιμορραγίας, κλείνεται το κοιλιακό τοίχωμα με ράμμα και το δέρμα με συνδετήρες ή ράμμα. Πριν χρησιμοποιηθούν τα ζώα, θα πρέπει να παρέχεται ελάχιστος χρόνος 14 ημερών για να αναρρώσουν και να υποχωρήσει το βάρος της μήτρας.

Σχήμα 2

Αφαίρεση και προετοιμασία των ιστών της μήτρας για μέτρηση του βάρους



Γραμμή αποκοπής κατά τη νεκροψία

Η διαδικασία αρχίζει με διάνοιξη του κοιλιακού τοιχώματος στην ηβική σύμφυση. Στη συνέχεια, κάθε ωθήκη, εάν υπάρχει, και κέρας της μήτρας αποσπώνται από το οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα. Η ουροδόχος κύστη και οι ουρητήρες απομακρύνονται από την πρόσθια και την πλάγια πλευρά της μήτρας και του κόλπου. Αποκολλάται η ινώδης σύμφυση μεταξύ του ορθού και του κόλπου έως ότου να μπορεί να εντοπιστεί η συμβολή στομίου του κόλπου και δέρματος του περινέου. Η μήτρα και ο κόλπος αποσπώνται από το σώμα με τομή στο τοίχωμα του κόλπου ακριβώς πάνω από τη συμβολή με το δέρμα του περινέου, όπως εμφανίζεται στο σχήμα. Η μήτρα θα πρέπει να αποσπάται από το τοίχωμα του σώματος με προσεκτική τομή του μεσεντερίου της στο σημείο πρόσφυσής του σε όλο το μήκος της πλαγιοραχιαίας όψης κάθε κέρατος. Μετά την απομάκρυνση από το σώμα, περικόπτονται η περίσσεια λίπους και ο συνδετικός ιστός. Εάν υπάρχουν οι ωθήκες, αφαιρούνται στη σάλπιγγα, με μέριμνα ώστε να μην υπάρξει απώλεια υγρού του αυλού από το κέρας της μήτρας. Εάν το ζώο έχει υποβληθεί σε ωθηκεκτομή, θα πρέπει να εξετάζονται τα στελέχη για τυχόν παρουσία ωθηκικού ιστού. Ο κόλπος αφαιρείται από τη μήτρα ακριβώς κάτω από τον τράχηλο, ώστε αυτός να παραμείνει μαζί με το σώμα της, όπως εμφανίζεται στο σχήμα. Η μήτρα είναι τότε έτοιμη για ζύγιση.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Αντιοιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση της 17β-οιστραδιόλης στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ημερομηνία γέννησης: η μεταγεννητική ημέρα 0.

Δοσολογία: γενικός όρος που περικλείει τη δόση, καθώς και τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό, η δόση εκφράζεται ως βάρος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά μονάδα σωματικού βάρους του ζώου που υποβάλλεται στη δοκιμή ανά ημέρα (π.χ. mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα).

Μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ): η μέγιστη ποσότητα μιας χημικής ουσίας που, όταν εισαχθεί στο σώμα, δεν προκαλεί τον θάνατο των ζώων της δοκιμής (συμβολίζεται με LD₅₀) (IUPAC, 1993).

Οιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως η 17β-οιστραδιόλη στον οργανισμό θηλαστικού.

Μεταγεννητική ημέρα X: η Χη ημέρα ζωής από την ημερομηνία γέννησης.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μητροτροφική: όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή θετικών επιδράσεων στην ανάπτυξη των ιστών της μήτρας

Επικύρωση: επιστημονική διαδικασία που έχει σχεδιαστεί για τον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και για την απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

Προσάρτημα 2

Σημείωση: Έγγραφο που έχει καταρτιστεί από τη Γραμματεία του Προγράμματος Κατευθυντήριων Γραμμών Δοκιμών βάσει της συμφωνίας που επιτεύχθηκε κατά την 6η συνεδρίαση της ειδικής ομάδας για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών (EDTA)

Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών

<p>1ο επίπεδο Διαλογή και ιεράρχηση βάσει υφιστάμενων πληροφοριών</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Φυσικές & χημικές ιδιότητες, π.χ. μοριακό βάρος, δραστικότητα, πιητικότητα, βιοαποικοδομησιμότητα — Έκθεση του ανθρώπου και του περιβάλλοντος, π.χ. όγκος παραγωγής, ελευθέρωση, μοντέλα χρήσης — Κίνδυνος, π.χ. διαθέσιμα τοξικολογικά δεδομένα 	
<p>2ο επίπεδο Προδιορισμοί in vitro που παρέχουν μηχανιστικά δεδομένα</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Συγγένεια σύνδεσης με υποδοχείς ER, AR, TR — Μεταγραφική ενεργοποίηση — Αρωματάση και στεροειδογένεση in vitro — Αναγνώριση υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων/σύνδεση με αυτόν — Μοντέλα QSAR (ποσοτική σχέση δομής-δραστικότητας) 	<ul style="list-style-type: none"> — Προδιαλογή υψηλής ταχύτητας ανάλυσης — Λειτουργία του θυρεοειδούς — Προδιορισμός βιτελλογενίνης σε ηπατοκύτταρα ιχθύων — Άλλοι (κατά περίπτωση)
<p>3ο επίπεδο Προδιορισμοί in vivo που παρέχουν δεδομένα για μεμονωμένους ενδοκρινικούς μηχανισμούς και επιδράσεις</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Μητροτροφικός προσδιορισμός (οιστρογόνα) — Προδιορισμός Hershberger (ανδρογόνα) — Λειτουργία ορμονών χωρίς τη μεσολάβηση υποδοχέα — Άλλοι (π.χ. θυρεοειδικοί) 	<ul style="list-style-type: none"> — Προδιορισμός VTG (βιτελλογενίνη) σε ιχθύες (οιστρογόνα)
<p>4ο επίπεδο Προδιορισμοί in vivo που παρέχουν δεδομένα για πολλαπλούς ενδοκρινικούς μηχανισμούς και επιδράσεις</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή αριθ. 407 του ΟΟΣΑ (καταληκτικά σημεία βάσει ενδοκρινικών μηχανισμών) — Προδιορισμοί σε αρσενικά και θηλυκά ζώα στην ήβη — Προδιορισμός σε ενήλικα άθικτα αρσενικά 	<ul style="list-style-type: none"> — Ιστοπαθολογικός προσδιορισμός σε γονάδες χιθύνων — Προδιορισμός μεταμόρφωσης σε βατράχους
<p>5ο επίπεδο Προδιορισμοί in vivo που παρέχουν δεδομένα για τις επιδράσεις ενδοκρινικών και άλλων μηχανισμών</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Προδιορισμός μίας γενεάς (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 415)¹ — Προδιορισμός δύο γενεών (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 416)¹ — Δοκιμή αναπαραγωγικής διαλογής (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 421)¹ — Συνδυασμένη δοκιμή 28 ημερών/αναπαραγωγικής διαλογής (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 422)¹ <p>¹ Οι ενδεδειγμένες βελτιώσεις στα μελετηθέν από την ομάδα VMG mammi</p>	

VMG mammi: ομάδα διαχείρισης της επικύρωσης για τις δοκιμές και την αξιολόγηση σε θηλαστικά

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΝΟΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΛΑΙΣΙΟΥ:

- Σημείωση 1: Η είσοδος και η έξοδος είναι δυνατή σε όλα τα επίπεδα και εξαρτάται από το είδος των υφιστάμενων αναγκών σε πληροφορίες για την εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.
- Σημείωση 2: Στο 5ο επίπεδο, η οικοτοξικολογία θα πρέπει να περιλαμβάνει τελικά σημεία που υποδηλώνουν μηχανισμούς δυσμενών επιδράσεων και ενδεχόμενες βλάβες στον πληθυσμό.
- Σημείωση 3: Όταν ένα πολυτροπικό μοντέλο καλύπτει περισσότερους από έναν προσδιορισμούς με ένα τελικό σημείο, το μοντέλο αυτό θα πρέπει να αντικαθιστά τη χρήση των εν λόγω προσδιορισμών ενός τελικού σημείου.
- Σημείωση 4: Κάθε χημική ουσία θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη όλων των διαθέσιμων πληροφοριών και με γνώμονα τη λειτουργία των επιπέδων του πλαισίου.
- Σημείωση 5: Το πλαίσιο δεν θα πρέπει επί του παρόντος να θεωρείται ότι περιλαμβάνει τα πάντα. Στο 3ο, το 4ο και το 5ο επίπεδο, περιλαμβάνει προσδιορισμούς που είτε είναι διαθέσιμοι είτε βρίσκονται στο στάδιο της επικύρωσης. Στη δεύτερη περίπτωση, οι προσδιορισμοί έχουν συμπεριληφθεί προσωρινά. Όταν αναπτυχθούν και επικυρωθούν, θα προστεθούν επισήμως στο πλαίσιο.
- Σημείωση 6: Το 5ο επίπεδο δεν πρέπει να θεωρείται ότι περιλαμβάνει μόνο οριστικές δοκιμές. Οι δοκιμές αυτού του επιπέδου θεωρείται ότι συμβάλλουν στη γενική εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- (3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.
- (4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- (5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.
- (6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- (7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549
- (8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.
- (9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- (10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [³H]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 17β-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- (12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

- (13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. *Science* 118:650-651.
- (14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 13:425-427.
- (15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. *Environ. Health Perspec.* 106:369-373.
- (16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- (17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145-157.
- (18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- (19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613-620.
- (20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477-485.
- (21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343-347.
- (22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381-393.
- (23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596-601.
- (24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 — 333.
- (28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 — 41.
- (29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 — 305.
- (30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 — 291.
- (31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- (33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401-416.

- (34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1-2): 159-184.
- (35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- (36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- (37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.
- (38) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς, ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33.

B.55. ΒΙΟΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ HERSHBERGER ΣΕ ΕΠΙΜΥΣΕΣ: ΒΡΑΧΥΠΡΟΘΕΣΜΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΟΓΗΣ ΓΙΑ (ΑΝΤΙ) ΑΝΔΡΟΓΟΝΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 441 (2009). Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας για την αναθεώρηση των υφιστάμενων κατευθυντήριων γραμμών, και την εκπόνηση νέων, σχετικά με τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών (1). Ένα στοιχείο της δραστηριότητας ήταν η εκπόνηση κατευθυντήριας γραμμής δοκιμών για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger σε επίμυες. Μετά από αρκετές δεκαετίες χρήσης του από τον φαρμακευτικό κλάδο, ο παρών προσδιορισμός τυποποιήθηκε για πρώτη φορά από επίσημη επιτροπή εμπειρογνομόνων, το 1962, ως εργαλείο διαλογής ανδρογόνων χημικών ουσιών (2). Την περίοδο 2001-2007, ο βιοπροσδιορισμός Hershberger σε επίμυες υποβλήθηκε σε εκτενές πρόγραμμα επικύρωσης, το οποίο περιλάμβανε τη σύνταξη ενός εγγράφου τεκμηρίωσης με επισκόπηση (23), ενός αναλυτικού εγγράφου μεθόδων (3) και ενός οδηγού ανατομής (21), καθώς και τη διεξαγωγή εκτενών ενδοεργαστηριακών και διεργαστηριακών μελετών για να καταδειχθούν η αξιοπιστία και η αναπαραγωγιμότητα του βιοπροσδιορισμού. Οι εν λόγω μελέτες επικύρωσης διεξήχθησαν με ένα ισχυρό ανδρογόνο αναφοράς (προπιονική τεστοστερόνη), δύο ισχυρά συνθετικά ανδρογόνα (οξική τρενβολόνη και μεθυλοτεστοστερόνη), μια ισχυρή αντιανδρογόνο φαρμακευτική ουσία (φλουταμίδη), έναν ισχυρό αναστολέα της σύνθεσης (φιναστερίδη) του φυσικού ανδρογόνου διυδροτεστοστερόνη (DHT), διάφορα ασθενή αντιανδρογόνα φυτοφάρμακα (λινουρόν, βινκλοζολίνη, προκυμιδόνη, p,p'-DDE), έναν ισχυρό αναστολέα της 5α-ρεδουκτάσης (φιναστερίδη) και δύο γνωστές αρνητικές χημικές ουσίες (δινιτροφαινόλη και ενεΰλοφαινόλη) (4) (5) (6) (7) (8). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι προϊόν της μακράς πείρας του παρελθόντος στον βιοπροσδιορισμό, καθώς και της πείρας που αποκομίστηκε κατά τη διάρκεια του προγράμματος δοκιμών επικύρωσης και των αποτελεσμάτων του.
2. Ο βιοπροσδιορισμός Hershberger είναι βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής in vivo με τη χρήση επικουρικών ιστών του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος. Ο προσδιορισμός αναπτύχθηκε τη δεκαετία του '30 και τροποποιήθηκε τη δεκαετία του '40 για να συμπεριληφθούν μύες του αρσενικού αναπαραγωγικού συστήματος που ανταποκρίνονται στα ανδρογόνα (2) (9-15). Τη δεκαετία του '60 αξιολογήθηκαν περισσότερα από 700 πιθανά ανδρογόνα με τη χρήση τυποποιημένης έκδοσης του πρωτοκόλλου (2) (14), ενώ η χρήση του προσδιορισμού, τόσο για τα ανδρογόνα όσο και για τα αντιανδρογόνα, θεωρούνταν πρότυπη μέθοδος τη συγκεκριμένη δεκαετία (2) (15). Ο ισχύων βιοπροσδιορισμός βασίζεται στις μεταβολές του βάρους πέντε ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών ευνουχισμένων αρσενικών επιμύων περιηβικής ηλικίας. Με αυτόν αξιολογείται η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να προκαλεί βιολογικές δραστηριότητες που αντιστοιχούν σε αγωνιστές ανδρογόνων, ανταγωνιστές ανδρογόνων ή αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης. Οι πέντε ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί-στόχοι που περιλαμβάνονται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι ο κοιλιακός λοβός του προστάτη, οι σπερματοδόχοι κύστες (μαζί με τα υγρά και τους πηκτοειδείς αδένες), οι ανελκτήρες του πρωκτού και οι βολβοσπαραγγώδεις μύες, το ζεύγος των βολβοουρηθραίων αδένων (αδένες του Cowper) και η βάλανος του πέους. Στους ευνουχισμένους αρσενικούς επίμυες περιηβικής ηλικίας και οι πέντε αυτοί ιστοί αντιδρούν στα ανδρογόνα με αύξηση του απόλυτου βάρους τους. Όταν οι ίδιοι ιστοί διεγείρονται με τη χορήγηση ενός ισχυρού ανδρογόνου αναφοράς για να αυξηθεί το βάρος τους, ανταποκρίνονται και οι πέντε στα αντιανδρογόνα με μείωση του απόλυτου βάρους τους. Το βασικό μοντέλο για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger ήταν τα χειρουργικά ευνουχισμένα αρσενικά ζώα περιηβικής ηλικίας και επικυρώθηκε κατά την 1η, τη 2η και την 3η φάση του προγράμματος επικύρωσης του Hershberger.
3. Ο βιοπροσδιορισμός Hershberger λειτουργεί ως μηχανιστικός προσδιορισμός διαλογής in vivo για αγωνιστές ανδρογόνων, ανταγωνιστές ανδρογόνων και αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης και η εφαρμογή του θα πρέπει να εντάσσεται στο "Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών" (προσάρτημα 2). Στο εν λόγω εννοιολογικό πλαίσιο, ο βιοπροσδιορισμός Hershberger περιλαμβάνεται στο 3ο επίπεδο ως προσδιορισμός in vivo που παρέχει δεδομένα σχετικά με έναν και μόνο ενδοκρινικό μηχανισμό, την (αντι)ανδρογονικότητα. Προορισμός του είναι να συμπεριλαμβάνεται σε μια δέσμη δοκιμών in vitro και in vivo για τον εντοπισμό χημικών ουσιών που μπορούν να αλληλεπιδρούν με το ενδοκρινικό σύστημα, με τελικό αποτέλεσμα εκτιμήσεις επικινδυνότητας και κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον.

4. Λόγω του ότι η διαδικασία ευνουχισμού εγείρει ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων, επιδιώχθηκε η χρήση άδικτων (μη ευνουχισμένων) διεγερμένων απογαλακτισμένων αρσενικών ζώων ως εναλλακτικού μοντέλου αντί του βιοπροσδιορισμού Hershberger, ώστε να αποφευχθεί το στάδιο του ευνουχισμού. Η μέθοδος δοκιμών σε διεγερμένα απογαλακτισμένα ζώα επικυρώθηκε (24). Ωστόσο, στις μελέτες επικύρωσης, η έκδοση του βιοπροσδιορισμού Hershberger με απογαλακτισμένα ζώα δεν αποδείχθηκε ικανή να ανιχνεύει με συνέπεια επιδράσεις στο βάρος των ανδρογονοεξαρτώμενων οργάνων από ασθενή αντιανδρογόνα στις ελεγχθείσες δόσεις. Για τον λόγο αυτό, δεν συμπεριελήφθη στην παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η εν λόγω έκδοση είναι εν τούτοις διαθέσιμη στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 115 του ΟΟΣΑ (25), επειδή αναγνωρίζεται ότι η χρήση της μπορεί να προσφέρει όχι μόνο οφέλη από πλευράς καλής μεταχείρισης των ζώων, αλλά και πληροφορίες σχετικά με άλλους τρόπους δράσης.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

5. Οι αγωνιστές και οι ανταγωνιστές ανδρογόνων δρουν ως συνδέτες των υποδοχέων ανδρογόνων και μπορούν να ενεργοποιούν ή να αναστέλλουν, αντιστοίχως, τη μεταγραφή γονιδίων που ελέγχεται από τους υποδοχείς. Επιπλέον, ορισμένες χημικές ουσίες αναστέλλουν τη μετατροπή της τεστοστερόνης σε ένα ισχυρότερο φυσικό ανδρογόνο, τη διυδροτεστοστερόνη, σε ορισμένους ιστούς-στόχους των ανδρογόνων (αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης). Αυτές οι χημικές ουσίες ενδεχομένως εγκυμονούν κινδύνους δυσμενών επιδράσεων στην υγεία, συμπεριλαμβανομένων επιδράσεων στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη. Είναι επομένως αναγκαία, για ρυθμιστικούς λόγους, η ταχεία εξέταση και αξιολόγηση χημικών ουσιών ως πιθανών αγωνιστών ή ανταγωνιστών των ανδρογόνων ή αναστολέων της 5α-ρεδουκτάσης. Η συγγένεια ενός συνδέτη με υποδοχέα ανδρογόνων, όπως μετράται από τη σύνδεση με τον υποδοχέα ή τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς *in vitro*, παρόλο που παρέχει πληροφορίες, δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που καθορίζει τον ενδεχόμενο κίνδυνο. Άλλοι καθοριστικοί παράγοντες είναι η μεταβολική ενεργοποίηση και αδρανοποίηση μετά την είσοδο στο σώμα, η χημική κατανομή στους ιστούς-στόχους και η απέκκριση από το σώμα. Ανακύπτει επομένως η ανάγκη ελέγχου της πιθανής δράσης μιας χημικής ουσίας *in vivo* υπό τις σχετικές συνθήκες και έκθεση. Η αξιολόγηση *in vivo* δεν είναι τόσο κρίσιμης σημασίας, εάν είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά της χημικής ουσίας που αφορούν την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME). Οι ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί ανταποκρίνονται με ταχεία και έντονη αύξηση στη διέγερση από τα ανδρογόνα, ιδίως στην περίπτωση των ευνουχισμένων αρσενικών επιμύων περιηβικής ηλικίας. Είδη τρωκτικών, ιδίως ο επίμυς, χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως σε μελέτες τοξικότητας για τον χαρακτηρισμό των κινδύνων. Συνεπώς, η έκδοση του προσδιορισμού στην οποία χρησιμοποιούνται ευνουχισμένοι επίμυες περιηβικής ηλικίας και πέντε ιστοί-στόχοι είναι κατάλληλη για την *in vivo* διάλογη αγωνιστών και ανταγωνιστών των ανδρογόνων και αναστολέων της 5α-ρεδουκτάσης.
6. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται στα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ΟΟΣΑ και έχουν αποδειχθεί αξιόπιστα και αναπαραγώγιμα σε ενδοεργαστηριακές και διεργαστηριακές μελέτες (4) (5) (6) (7) (8). Στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρουσιάζονται διαδικασίες τόσο με ανδρογόνα όσο και με αντιανδρογόνα.
7. Παρά την ελαφρώς διαφορετική δόση προπιονικής τεστοστερόνης που χρησιμοποιήσαν τα διάφορα εργαστήρια για την ανίχνευση αντιανδρογόνων στο πλαίσιο του προγράμματος του ΟΟΣΑ για την επικύρωση του βιοπροσδιορισμού Hershberger (0,2 έναντι 0,4 mg/kg/ημέρα με υποδόρια ένεση), υπήρξε μικρή διαφορά μεταξύ αυτών των δύο παραλλαγών του πρωτοκόλλου ως προς την ικανότητα ανίχνευσης ασθενούς ή ισχυρής αντιανδρογονικής δράσης. Ωστόσο, είναι σαφές ότι η δόση προπιονικής τεστοστερόνης δεν θα πρέπει να είναι τόσο υψηλή ώστε να αναστέλλει τις επιδράσεις ασθενών ανταγωνιστών των υποδοχέων ανδρογόνων ούτε τόσο χαμηλή ώστε οι διεγερμένοι από ανδρογόνο ιστοί να εμφανίζουν μικρή αυξητική αντίδραση ακόμα και χωρίς συγχρόνηση αντιανδρογόνων.
8. Η αυξητική αντίδραση των επιμέρους ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών δεν οφείλεται αποκλειστικά στα ανδρογόνα, δηλ. και άλλες χημικές ουσίες εκτός των αγωνιστών των ανδρογόνων μπορούν να μεταβάλλουν το βάρος ορισμένων ιστών. Ωστόσο, η ταυτόχρονη αυξητική αντίδραση πολλών ιστών τεκμηριώνει την ύπαρξη ενός ειδικότερου ανδρογονικού μηχανισμού. Παραδείγματος χάριν, υψηλές δόσεις ισχυρών οιστρογόνων μπορούν να αυξήσουν το βάρος των σπερματοδόχων κύστεων. Ωστόσο, οι υπόλοιποι ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί του προσδιορισμού δεν αντιδρούν με ανάλογο τρόπο. Τα χημικά αντιανδρογόνα μπορούν να δράσουν είτε ως ανταγωνιστές υποδοχέων ανδρογόνων είτε ως αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης. Οι αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης έχουν ποικίλες επιδράσεις, διότι η μετατροπή στην ισχυρότερη διυδροτεστοστερόνη διαφέρει μεταξύ των ιστών. Τα αντιανδρογόνα που αναστέλλουν την 5α-ρεδουκτάση, όπως η φιναστερίδη, έχουν εντονότερες επιδράσεις στον κοιλιακό λοβό του προστάτη από ό,τι σε άλλους ιστούς, σε σύγκριση με έναν ισχυρό ανταγωνιστή υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η φλουταμίδα. Αυτή η διαφορά στην αντίδραση των ιστών μπορεί να αξιοποιηθεί για τη διαφοροποίηση των τρόπων δράσης μέσω υποδοχέα ανδρογόνων και μέσω της 5α-ρεδουκτάσης. Επιπλέον, ο υποδοχέας ανδρογόνων σχετίζεται εξελικτικά με τους υποδοχείς άλλων στεροειδών ορμονών και ορισμένες άλλες ορμόνες, όταν χορηγούνται σε υψηλά επίπεδα δόσης που υπερβαίνουν τα φυσιολογικά όρια, μπορούν να δεμεύσουν και να ανταγωνιστούν τις αυξητικές επιδράσεις της προπιονικής τεστοστερόνης (13). Είναι επίσης ευλογοφανές ότι η ενίσχυση του μεταβολισμού των στεροειδών και η συνακόλουθη μείωση της τεστοστερόνης ορού θα μπορούσαν να μειώσουν την αύξηση των ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών. Συνεπώς, κάθε θετικό αποτέλεσμα του βιοπροσδιορισμού Hershberger θα πρέπει κανονικά να αξιολογείται με προσέγγιση βάρους της μαρτυρίας, συμπεριλαμβανομένων προσδιορισμών *in vitro*, όπως οι προσδιορισμοί σύνδεσης με υποδοχείς ανδρογόνων και οιστρογόνων και οι αντίστοιχοι προσδιορισμοί μεταγραφικής ενεργοποίησης, ή μέσω άλλων προσδιορισμών *in vivo* κατά τους οποίους εξετάζονται ανάλογοι ιστοί-στόχοι των ανδρογόνων, όπως ο προσδιορισμός με αρσενικά ζώα στην ήβη, ο προσδιορισμός 15 ημερών με άδικτα ενήλικα αρσενικά ζώα ή οι μελέτες 28 ή 90 ημερών με επαναλαμβανόμενη δόση.

9. Η πείρα έχει δείξει ότι τα ξеноβιοτικά ανδρογόνα είναι σπανιότερα από τα ξеноβιοτικά αντιανδρογόνα. Αναμένεται επομένως ότι ο βιοπροσδιορισμός Hershberger θα χρησιμοποιείται συχνότερα για τη διαλογή αντιανδρογόνων. Παρόλα αυτά, η διαδικασία δοκιμής ανδρογόνων θα μπορούσε να συνιστάται για στεροειδείς χημικές ουσίες, χημικές ουσίες που δρουν όπως τα στεροειδή ή χημικές ουσίες για τις οποίες προέκυψαν ενδείξεις πιθανών ανδρογονικών επιδράσεων από μεθόδους που περιλαμβάνονται στο 1ο ή το 2ο επίπεδο του εννοιολογικού πλαισίου (προσάρτημα 2). Ομοίως, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν δυσμενείς επιδράσεις που σχετίζονται με (αντι)ανδρογονικά χαρακτηριστικά στους προσδιορισμούς του 5ου επιπέδου, καθιστώντας αναγκαία την αξιολόγηση του κατά πόσον μια χημική ουσία δρα ενδοκρινικά ή όχι.
10. Αναγνωρίζεται ότι όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν ζώα πρέπει να είναι σύμφωνες με τα τοπικά πρότυπα περί φροντίδας των ζώων. Οι περιγραφές φροντίδας και αγωγής που παρατίθενται κατωτέρω αποτελούν ελάχιστα πρότυπα επιδόσεων και αντικαθίστανται από τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (26). Περαιτέρω καθοδήγηση για την ανώδυνη μεταχείριση των ζώων παρέχει ο ΟΟΣΑ (17).
11. Όπως σε κάθε βιοπροσδιορισμό στον οποίο χρησιμοποιούνται πειραματόζωα, θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά η ανάγκη διεξαγωγής της παρούσας μελέτης. Κατά βάση, δύο είναι ενδεχομένως οι λόγοι που υπαγορεύουν τη λήψη μιας τέτοιας απόφασης:
- υψηλή πιθανότητα έκθεσης (1ο επίπεδο του εννοιολογικού πλαισίου) ή ενδείξεις (αντι)ανδρογονικότητας σε προσδιορισμούς *in vitro* (2ο επίπεδο), που συνηγορούν υπέρ του διερευνηθεί αν οι επιδράσεις αυτές είναι δυνατόν να ανακύψουν *in vivo*.
 - επιδράσεις αντίστοιχες της (αντι)ανδρογονικότητας σε δοκιμές *in vivo* 4ου ή 5ου επιπέδου, που συνηγορούν υπέρ της διερεύνησης του συγκεκριμένου τρόπου δράσης, π.χ. για να διαπιστωθεί αν οι επιδράσεις οφείλονται σε (αντι)ανδρογονικό μηχανισμό.
12. Οι ορισμοί που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα 1.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

13. Η ευαισθησία του βιοπροσδιορισμού Hershberger εξασφαλίζεται μέσω της χρήσης αρσενικών ζώων με ελάχιστη παραγωγή ενδογενών ανδρογόνων. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ευνουχισμένων αρσενικών ζώων στα οποία έχει δοθεί επαρκής χρόνος μετά τον ευνουχισμό ώστε οι ιστοί-στόχοι να επανέλθουν σε ένα ελάχιστο και ομοιόμορφο βάρος. γραμμής βάσης. Ως εκ τούτου, κατά τον έλεγχο της δυννητικής ανδρογονικής δράσης, τα ενδογενή επίπεδα κυκλοφορούντων ανδρογόνων είναι χαμηλά, ο άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων έχει καταστεί ανίκανος να αντισταθμίσει τα χαμηλά αυτά επίπεδα μέσω μηχανισμών ανατροφοδότησης, η ικανότητα ανταπόκρισης των ιστών έχει μεγιστοποιηθεί και η μεταβλητότητα του αρχικού βάρους των ιστών έχει ελαχιστοποιηθεί. Κατά τον έλεγχο της δυννητικής αντιανδρογονικής δράσης, μπορεί να επιτευχθεί ουσιαστικότερη αύξηση του βάρους των ιστών μέσω της διέγερσής τους με ένα ανδρογόνο αναφοράς. Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι να απαιτούνται για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger μόνο 6 ζώα ανά ομάδα δόσης, ενώ για άλλους προσδιορισμούς με άδικτα αρσενικά ζώα στην ήβη ή ενήλικα συνιστάται η χρήση 15 αρσενικών ζώων ανά ομάδα δόσης.
14. Οι αρσενικοί επίμυες περιηβικής ηλικίας θα πρέπει να ευνουχίζονται με τον ενδεδειγμένο τρόπο και με τη χρήση εγκεκριμένων αναισθητικών και άσηπτης τεχνικής. Τις πρώτες μέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση θα πρέπει να χορηγούνται αναλγητικά ώστε να εξαφανίζεται η μετεγχειρητική δυσφορία. Ο ευνουχισμός βελτιώνει την ακρίβεια του προσδιορισμού όσον αφορά την ανίχνευση ασθενών ανδρογόνων και αντιανδρογόνων, εξαλείφοντας, αφενός τους αντισταθμιστικούς ενδοκρινικούς μηχανισμούς ανατροφοδότησης που υπάρχουν στα άδικτα ζώα και μπορούν να μετριάσουν τις επιδράσεις των χορηγούμενων ανδρογόνων και αντιανδρογόνων και, αφετέρου, τη μεγάλη μεταβλητότητα των επιπέδων τεστοστερόνης στον ορό μεταξύ των ζώων. Συνεπώς, με τον ευνουχισμό μειώνεται ο απαιτούμενος αριθμός ζώων για τη διαλογή ως προς τις συγκεκριμένες ενδοκρινικές δράσεις.
15. Κατά τη διαλογή ως προς τη δυννητική ανδρογονική δράση, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση για περίοδο δέκα συνεχών ημερών. Οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες χορηγούνται σε δύο τουλάχιστον ομάδες πειραματόζωων αγωγής, με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα. Τα ζώα νεκροτομούνται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Μια στατιστικά σημαντική αύξηση του βάρους δύο ή περισσότερων οργάνων-στόχων στις ομάδες αγωγής με την ελεγχόμενη χημική ουσία σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων που έχει λάβει τον φορέα υποδηλώνει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι θετική για δυννητική ανδρογονική δράση (βλ. παράγραφο 60). Τα ανδρογόνα όπως η τρενβολόνη, που δεν μπορούν να αναχθούν μέσω της 5α-ρεδουκτάσης, έχουν εντονότερες επιδράσεις στους ανελκκτήρες του πρωκτού και τους βολβοσηραγγώδεις μύες, καθώς και στη βάλανο του πέους, σε σύγκριση με την προπιονική τεστοστερόνη, αλλά όλοι οι ιστοί θα πρέπει να εμφανίζουν αυξημένη ανάπτυξη.
16. Κατά τη διαλογή ως προς την αντιανδρογονική δράση, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται καθημερινά με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση για περίοδο δέκα συνεχών ημερών, μαζί με καθημερινές δόσεις προπιονικής τεστοστερόνης (0,2 ή 0,4 mg/kg/ημέρα) με υποδόρια ένεση. Στο πρόγραμμα επικύρωσης προσδιορίστηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιούνται είτε 0,2 είτε 0,4 mg προπιονικής τεστοστερόνης/kg/ημέρα, καθώς οι δύο ποσότητες είναι εξίσου αποτελεσματικές στην ανίχνευση αντιανδρογόνων, και επομένως, θα πρέπει να επιλέγεται μόνο μία δόση για να χρησιμοποιηθεί στον

προσδιορισμό. Χορηγούνται κλιμακωτές δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε τρεις τουλάχιστον ομάδες πειραματόζων αγωγής, με ένα επίπεδο δόσης ανά ομάδα. Τα ζώα νεκροτομούνται περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία δόση. Μια στατιστικά σημαντική μείωση του βάρους δύο ή περισσότερων οργάνων-στόχων στις ομάδες που έχουν λάβει την ελεγχόμενη χημική ουσία και προπιονική τεστοστερόνη, σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων στην οποία χορηγείται μόνο προπιονική τεστοστερόνη, υποδηλώνει ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία είναι θετική για δυνητική αντιανδρογονική δράση (βλ. παράγραφο 61).

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Επιλογή είδους και στελέχους

17. Η χρήση επιμύων στον βιοπροσδιορισμό Hershberger αποτελεί συνήθη πρακτική από τη δεκαετία του '30. Παρόλο που είναι βιολογικά ευλογοφανές να παρουσιάζουν οι επίμυες και οι ποντικοί παρόμοιες αντιδράσεις, οι επίμυες αποτελούν το προτιμώμενο είδος για τον βιοπροσδιορισμό Hershberger βάσει της 70ετούς πείρας με το μοντέλο επιμύων. Επιπλέον, δεδομένου ότι ο βιοπροσδιορισμός Hershberger ενδέχεται να είναι το προκαταρκτικό στάδιο μακροπρόθεσμης μελέτης πολλών γενεών, μπορούν να χρησιμοποιούνται και στις δύο μελέτες ζώα του ίδιου είδους και του ίδιου στελέχους και προέλευσης.
18. Το παρόν πρωτόκολλο παρέχει στα εργαστήρια τη δυνατότητα να επιλέγουν το στέλεχος επιμύων που θα χρησιμοποιήσουν στον προσδιορισμό, η οποία θα πρέπει γενικά να είναι η εκείνη που χρησιμοποιεί παραδοσιακά το εκάστοτε εργαστήριο. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα συνήθη στελέχη εργαστηριακών επιμύων. Ωστόσο, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη που ωριμάζουν αρκετά αργότερα από την ηλικία των 42 ημερών, δεδομένου ότι ο ευνουχισμός των αρσενικών ζώων των στελεχών αυτών σε ηλικία 42 ημερών αποκλείει μάλλον τη μέτρηση του βάρους της βαλάνου του πέους, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο μετά τον διαχωρισμό της πόσθης από τον κορμό του πέους. Συνεπώς, δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη που προέρχονται από τον επίμυ Fisher 344, εκτός από σπάνιες περιπτώσεις. Ο επίμυ Fisher 344 παρουσιάζει διαφορετικό χρόνο σεξουαλικής ανάπτυξης σε σύγκριση με άλλες συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα στελέχη, όπως οι Sprague Dawley και Wistar (16). Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί αυτό το στέλεχος, το εργαστήριο θα πρέπει να ευνουχίσει τους επίμυες σε ελαφρώς μεγαλύτερη ηλικία και να μπορεί να αποδείξει την ευαισθησία του χρησιμοποιούμενου στελέχους. Το εργαστήριο θα πρέπει να αναφέρει επακριβώς τους λόγους επιλογής του στελέχους επιμύων. Σε περίπτωση που ο προσδιορισμός διαλογής είναι προκαταρκτικό στάδιο μελέτης με επαναλαμβανόμενη δόση από το στόμα, μελέτης της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής ή μακροπρόθεσμης μελέτης, θα πρέπει κατά προτίμηση να χρησιμοποιούνται ζώα του ίδιου στελέχους και προέλευσης σε όλες τις μελέτες.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

19. Όλες οι διαδικασίες θα πρέπει να είναι σύμφωνες με το σύνολο των τοπικών προτύπων φροντίδας των πειραματόζων. Οι παρούσες περιγραφές φροντίδας και αγωγής αποτελούν ελάχιστα πρότυπα και αντικαθίστανται από τις αυστηρότερες τοπικές ρυθμίσεις, όπως η οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (26). Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζων θα πρέπει να είναι 22 °C (με εύρος τιμών ± 3 °C περίπου). Η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει μέγιστο ποσοστό 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου. Στόχος θα πρέπει να είναι μια τιμή σχετικής υγρασίας 50-60 %. Ο φωτισμός πρέπει να είναι τεχνητός με ημερήσια φωτοπερίοδο 12 ωρών.
20. Η ομαδική στέγαση είναι προτιμότερη από την απομόνωση, λόγω του νεαρού της ηλικίας των ζώων και του ότι οι επίμυες είναι κοινωνικά ζώα. Με τη στέγαση δύο ή τριών ζώων ανά κλωβό αποφεύγεται ο συνωστισμός και το συνακόλουθη ένταση που ενδέχεται να παρεμποδίσει τον ορμονικό έλεγχο της ανάπτυξης των επικουρικών γεννητικών ιστών. Οι κλωβοί θα πρέπει να καθαρίζονται σχολαστικά ώστε να απομακρύνονται πιθανές προσμειξεις, η δε διάταξή τους θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση των κλωβών. Με τη χρήση κλωβών κατάλληλου μεγέθους (περίπου 2 000 τετραγ. εκατοστών) αποφεύγεται ο υπερπληθυσμός.
21. Κάθε ζώο θα πρέπει να φέρει ατομικό αναγνωριστικό (π.χ. ενώτιο ή ετικέτα) τοποθετούμενο με ανώδυνη μέθοδο. Η μέθοδος ταυτοποίησης θα πρέπει να καταγράφεται.
22. Το εργαστηριακό σιτηρέσιο και πόσιμο νερό πρέπει να παρέχονται κατά βούληση. Τα εργαστήρια που εκτελούν τον βιοπροσδιορισμό Hershberger θα πρέπει να χρησιμοποιούν το εργαστηριακό σιτηρέσιο που χρησιμοποιούν συνήθως στις οικείες εργασίες δοκιμών χημικών ουσιών. Στις μελέτες επικύρωσης του βιοπροσδιορισμού δεν παρατηρήθηκαν επιδράσεις ούτε μεταβλητότητα που να μπορούν να αποδοθούν στην τροφή. Θα πρέπει να καταγράφεται το χρησιμοποιούμενο εργαστηριακό σιτηρέσιο και ένα δείγμα του να φυλάσσεται για ενδεχόμενη μελλοντική ανάλυση.

Κριτήρια επίδοσεων όσον αφορά το βάρος των ανδρογονοεξαρτώμενων οργάνων

23. Κατά τη διάρκεια της μελέτης επικύρωσης δεν προέκυψαν στοιχεία που να δείχνουν ότι η μείωση του σωματικού βάρους επηρεάζει προς τα πάνω ή προς τα κάτω την αύξηση του βάρους των ιστών-στόχων (δηλ. αυτών που πρέπει να ζυγίζονται στην παρούσα μελέτη).

24. Μεταξύ των διαφόρων στελεχών επιμύων που χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία στο πρόγραμμα επικύρωσης, το βάρος των ανδρογονοεξαρτώμενων οργάνων ήταν μεγαλύτερο στα στελέχη με μεγαλύτερο βάρος σε σύγκριση με τα ελαφρότερα στελέχη. Κατόπιν τούτου, στα κριτήρια επιδόσεων του βιοπροσδιορισμού Hershberger δεν περιλαμβάνεται το αναμενόμενο απόλυτο βάρος των οργάνων των θετικών και των αρνητικών μαρτύρων.
25. Λόγω του ότι ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) για έναν ιστό είναι αντιστρόφως ανάλογος της στατιστικής ισχύος, τα κριτήρια επιδόσεων του βιοπροσδιορισμού Hershberger βασίζονται σε μέγιστες τιμές CV για κάθε ιστό (πίνακας 1). Οι τιμές CV προέρχονται από τις μελέτες επικύρωσης του ΟΟΣΑ. Σε περίπτωση αρνητικού αποτελέσματος, τα εργαστήρια θα πρέπει να εξετάζουν τους CV της ομάδας μαρτύρων και της ομάδας αγωγής με την υψηλή δόση, για να διαπιστώσουν αν έχει σημειωθεί υπέρβαση των κριτηρίων επιδόσεων βάσει του μέγιστου CV.
26. Η μελέτη θα πρέπει να επαναλαμβάνεται εάν 1) τρεις ή περισσότεροι από τους δέκα πιθανούς ατομικούς CV στην ομάδα μαρτύρων και στην ομάδα αγωγής με την υψηλή δόση υπερβαίνουν τις μέγιστες τιμές που καθορίζονται για τις μελέτες αγωνιστών και ανταγωνιστών στον πίνακα 1 και 2) τουλάχιστον δύο ιστοί-στόχοι είναι οριακά αμελητέοι, ήτοι οι τιμές ρ κυμαίνονται μεταξύ 0,05 και 0,10.

Πίνακας 1

Μέγιστοι επιτρεπτοί CV που προσδιορίστηκαν στις μελέτες επικύρωσης του ΟΟΣΑ για τους επικουρικούς γεννητικούς ιστούς-στόχους στο μοντέλο με ευνουχισμένα ζώα ⁽¹⁾

Ιστός	Αντιανδρογονικές επιδράσεις	Ανδρογονικές επιδράσεις
Σπερματοδόχοι κύστεις	40 %	40 %
Κοιλιακός λοβός του προστάτη	40 %	45 %
Ανεκκτήρες του πρωκτού και βολβο-σηραγγώδεις μύες	20 %	30 %
Βολβοουρηθραίοι αδένες	35 %	55 %
Βάλανος του πέους	17 %	22 %

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Συμμόρφωση με τις ρυθμίσεις και έλεγχος των εργαστηρίων

27. Σε αντίθεση με τον μητροτροφικό προσδιορισμό (κεφάλαιο B.54 του παρόντος παραρτήματος), δεν απαιτείται για τον προσδιορισμό Hershberger απόδειξη της ικανότητας του εργαστηρίου πριν από την έναρξη της μελέτης, διότι εξετάζονται συντρέχοντες θετικοί (προπιονική τεστοστερόνη και φλουταμίδη) και αρνητικοί μάρτυρες ως αναπόσπαστο μέρος του προσδιορισμού.

Αριθμός και κατάσταση των ζώων

28. Κάθε ομάδα αγωγής και μαρτύρων θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον 6 ζώα. Αυτό ισχύει τόσο για το πρωτόκολλο με ανδρογόνα, όσο και για το πρωτόκολλο με αντιανδρογόνα.

Ευνουχισμός

29. Θα πρέπει να προβλέπεται μια αρχική περίοδος εγκλιματισμού, διάρκειας αρκετών ημερών, μετά την παραλαβή των ζώων, ώστε να εξασφαλίζεται ότι αυτά είναι υγιή και ακμαία ζώα. Δεδομένου ότι, εάν τα ζώα ευνουχιστούν πριν από την ηλικία των 42 ημερών ή 42η μεταγεννητική ημέρα (ΜΓΗ), ενδέχεται να μην έχει ακόμη διαχωριστεί η πόσθη, τα ζώα πρέπει να ευνουχίζονται την 42η ΜΓΗ ημέρα ή αργότερα, όχι νωρίτερα. Τα ζώα ευνουχίζονται υπό αναισθησία, με τομή στο όσχεο και αφαίρεση των όρχεων και των επιδιδυμίδων και με απολίνωση των αιμοφόρων αγγείων και των σπερματικών πόρων. Αφού επιβεβαιωθεί η απουσία αιμορραγίας, το όσχεο κλείνεται με ράμμα ή συνδετήρες. Τις πρώτες ημέρες μετά τη χειρουργική επέμβαση θα πρέπει να χορηγούνται αναλγητικά στα ζώα για να ανακουφίζονται από τυχόν μετεγχειρητική δυσφορία. Σε περίπτωση αγοράς ευνουχισμένων ζώων από προμηθευτή, ο τελευταίος θα πρέπει να βεβαιώνει την ηλικία των ζώων και το στάδιο σεξουαλικής ωρίμασης.

⁽¹⁾ Η τιμή καστωφλίου του CV για δεδομένο ιστό καθορίστηκε από ένα διάγραμμα τιμών CV —διατεταγμένων κατ' αύξουσα σειρά— για όλες τις μέσες τιμές από όλα τα πειράματα της διαδικασίας επικύρωσης με τη χρήση συγκεκριμένου μοντέλου (αγωνιστών ή ανταγωνιστών). Η τιμή καστωφλίου του CV ελήφθη από το σημείο στο οποίο οι αυξήσεις μεταξύ ενός CV και του αμέσως υψηλότερου στη σειρά είναι ιδιαίτερες μεγαλύτερες από αυτές μεταξύ των προηγούμενων CV, δηλ. από το "σημείο διαχωρισμού". Πρέπει να σημειωθεί ότι, παρόλο που με την ανάλυση αυτή καθορίστηκαν σχετικά αξιόπιστα "σημεία διαχωρισμού" για το μοντέλο ανταγωνιστών του προσδιορισμού, οι καμπύλες του CV για τον προσδιορισμό με αγωνιστές παρουσίαζαν περισσότερο ομοιόμορφη αύξηση, καθιστώντας τον καθορισμό τιμής κατωφλίου του CV με τη συγκεκριμένη μέθοδο κάπως αυθαίρετο.

Εγκλιματισμός μετά τον ευνουχισμό

30. Ο εγκλιματισμός των ζώων στις εργαστηριακές συνθήκες θα πρέπει να συνεχίζεται τουλάχιστον για 7 ημέρες μετά τον ευνουχισμό, ώστε να παρέχεται χρόνος για την υποχώρηση του βάρους των ιστών-στόχων. Τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται καθημερινά και όσα εμφανίζουν ενδείξεις ασθένειας ή σωματικές ανωμαλίες θα πρέπει να απομακρύνονται. Συνεπώς, η αγωγή με τη χορήγηση δόσεων (στο πλαίσιο της μελέτης) μπορεί να αρχίζει από την ηλικία των 49 ημερών αλλά όχι αργότερα από την 60ή ΜΓΗ. Η ηλικία κατά τη νεκροψία δεν θα πρέπει να υπερβαίνει την 70ή ΜΓΗ. Αυτή η ευελιξία επιτρέπει στο εργαστήριο να προγραμματίζει αποδοτικά το πειραματικό έργο.

Σωματικό βάρος και τυχαιοποιημένη συγκρότηση των ομάδων

31. Οι διαφορές ατομικού σωματικού βάρους αποτελούν πηγή μεταβλητότητας του βάρους των ιστών, τόσο στο εσωτερικό όσο και μεταξύ των ομάδων ζώων. Η αύξηση της μεταβλητότητας του βάρους των ιστών οδηγεί σε αυξημένο συντελεστή μεταβλητότητας (CV) και μειώνει τη στατιστική ισχύ του προσδιορισμού (καλούμενη ορισμένες φορές ευαισθησία του προσδιορισμού). Ως εκ τούτου, οι αποκλίσεις του σωματικού βάρους θα πρέπει να ελέγχονται, τόσο πειραματικά όσο και στατιστικά.
32. Ο πειραματικός έλεγχος περιλαμβάνει την εξασφάλιση μικρών αποκλίσεων του σωματικού βάρους εντός και μεταξύ των ομάδων της μελέτης. Πρώτον, τα ασυνήθιστα μικρά ή μεγάλα ζώα θα πρέπει να αποφεύγονται και να μην τοποθετούνται στην κούρτη της μελέτης. Κατά την έναρξη της μελέτης, η απόκλιση του βάρους των χρησιμοποιούμενων ζώων δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους (π.χ. $175\text{ g} \pm 35\text{ g}$ στην περίπτωση των ευνουχισμένων επιμύων περιηβικής ηλικίας). Δεύτερον, τα ζώα θα πρέπει να κατανέμονται σε ομάδες (μαρτύρων και αγωγής) με τυχαιοποιημένη κατανομή βάρων, ώστε το μέσο σωματικό βάρος κάθε ομάδας να μη διαφέρει στατιστικά από εκείνο οποιασδήποτε άλλης ομάδας. Θα πρέπει να καταγράφεται η εφαρμοζόμενη διαδικασία τυχαιοποίησης σε ομάδες.
33. Δεδομένου ότι η τοξικότητα μπορεί να επιφέρει μείωση του σωματικού βάρους στις ομάδες αγωγής σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στατιστική συμμεταβλητή το σωματικό βάρος κατά την πρώτη ημέρα χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και όχι το σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία.

Δοσολογία

34. Για να διαπιστωθεί αν μια ελεγχόμενη χημική ουσία μπορεί να έχει ανδρογονική δράση in vivo, αρκούν κατά κανόνα δύο ομάδες δόσης στις οποίες χορηγείται η ελεγχόμενη χημική ουσία και ομάδες θετικών μαρτύρων και μαρτύρων στους οποίους χορηγείται ο φορέας (αρνητικοί μάρτυρες) (βλ. παράγραφο 43). Συνεπώς, ο συγκεκριμένος σχεδιασμός προτιμάται για λόγους καλής μεταχείρισης των ζώων. Εάν σκοπός είναι είτε η χάραξη καμπύλης δόσης-απόκρισης είτε η παρέκταση σε χαμηλότερα επίπεδα δόσης, απαιτούνται τουλάχιστον 3 ομάδες δόσης. Εάν απαιτούνται πληροφορίες πέραν του προσδιορισμού της ανδρογονικής δράσης (π.χ. εκτίμηση ισχύος), θα πρέπει να εξετάζονται διαφορετικά δοσολογικά σχήματα. Για τον έλεγχο αντιανδρογόνων, η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μαζί με έναν αγωνιστή ανδρογόνων αναφοράς. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 3 ομάδες αγωγής με διαφορετικές δόσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, μία ομάδα θετικών μαρτύρων και μία ομάδα αρνητικών (βλ. παράγραφο 44). Εκτός από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Εάν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων θα πρέπει να λαμβάνουν τον φορέα στον μεγαλύτερο όγκο που χρησιμοποιείται στις ομάδες δοκιμής.
35. Όλα τα επίπεδα δόσης θα πρέπει να προτείνονται και να επιλέγονται λαμβανομένων υπόψη των διαθέσιμων δεδομένων για την τοξικότητα και την (τοξικο)κινητική της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ή συγγενών υλών. Για το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, πρώτον, η τιμή LD_{50} και/ή οι πληροφορίες για την οξεία τοξικότητα, ώστε να αποφεύγονται ο θάνατος, η σοβαρή ταλαιπωρία και το άγχος των ζώων (17) (18) (19) (20), και δεύτερον, οι διαθέσιμες πληροφορίες για τις δόσεις που χρησιμοποιούνται σε υποχρόνιες και χρόνιες μελέτες. Γενικά, η μέγιστη δόση δεν θα πρέπει να προκαλεί μείωση του τελικού σωματικού βάρους των ζώων κατά περισσότερο από 10% του βάρους των μαρτύρων. Η μέγιστη δόση θα πρέπει να είναι είτε 1) η μέγιστη δόση που εξασφαλίζει την επιβίωση των ζώων και δεν τους προκαλεί σημαντική τοξικότητα ή αγωνία μετά από 10 συνεχείς ημέρες χορήγησης δόσεων, με ανώτατο όριο τα $1\ 000\text{ mg/kg/ημέρα}$ (βλ. παράγραφο 36), ή 2) μια δόση που επάγει (αντι)ανδρογονικές επιδράσεις, αναλόγως του ποια από τις δύο είναι χαμηλότερη. Ως κριτήριο διαλογής, είναι αποδεκτά τα μεγάλα διαστήματα μεταξύ των δόσεων, π.χ. μία ημιλογαριθμική μονάδα (που αντιστοιχεί σε λόγο ακολουθίας δόσεων 3,2) ή ακόμη και μία λογαριθμική μονάδα. Εάν δεν διατίθενται κατάλληλα δεδομένα είναι δυνατόν να διεξαχθεί μελέτη καθορισμού εύρους (βλ. παράγραφο 37) για τη διευκόλυνση του προσδιορισμού των δόσεων που θα χρησιμοποιηθούν.

Οριακή δόση

36. Εάν μια δοκιμή με οριακή δόση $1\ 000\text{ mg/kg}$ σωματικού βάρους/ημέρα και μια χαμηλότερη δόση, με την εφαρμογή των διαδικασιών που περιγράφονται στην παρούσα μελέτη, δεν έχει ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μεταβολή του βάρους των αναπαραγωγικών οργάνων, τα πρόσθετα επίπεδα δόσεων μπορούν να θεωρηθούν περιττά. Η οριακή δόση εφαρμόζεται εφόσον από τα δεδομένα έκθεσης του ανθρώπου δεν προκύπτει ανάγκη χρησιμοποίησης υψηλότερου επιπέδου δόσης.

Ζητήματα σχετικά με τον καθορισμό εύρους

37. Εάν είναι απαραίτητο, μπορεί να διεξαχθεί προκαταρκτική μελέτη καθορισμού εύρους με λίγα ζώα για την επιλογή κατάλληλων ομάδων δόσης [με τη χρήση των μεθόδων δοκιμών οξείας τοξικότητας (κεφάλαια Β.1 α και Β.1 β του παρόντος παραρτήματος (27), TG 425 του ΟΟΣΑ (19))]. Στόχος στην περίπτωση του βιοπροσδιορισμού Hershberger είναι η επιλογή δόσεων που εξασφαλίζουν την επιβίωση των ζώων και δεν τους προκαλούν σημαντική τοξικότητα ή αγωνία μετά από δέκα συνεχείς ημέρες χορήγησης της χημικής ουσίας σε δόσεις που δεν υπερβαίνουν την οριακή δόση των 1 000 mg/kg/ημέρα, όπως σημειώνεται στις παραγράφους 35 και 36. Για τη μελέτη αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα καθοδηγητικό έγγραφο του ΟΟΣΑ (17) που ορίζει τα κλινικά σημεία τοξικότητας ή αγωνίας στα ζώα. Εάν είναι εφικτό στο πλαίσιο της εν λόγω μελέτης καθορισμού εύρους, μετά από δέκα ημέρες χορήγησης δόσεων οι ιστοί-στόχοι εκτέμνονται και ζυγίζονται περίπου 24 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης. Τα δεδομένα αυτά μπορούν έπειτα να χρησιμοποιηθούν ως βοήθημα κατά την επιλογή δόσεων για την κυρίως μελέτη.

Χημικές ουσίες αναφοράς και φορέας

38. Ο αγωνιστής ανδρογόνων αναφοράς θα πρέπει να είναι η προπιονική τεστοστερόνη, αριθ. CAS 57-82-5. Η δοσολογία αναφοράς της προπιονικής τεστοστερόνης μπορεί να είναι είτε 0,2 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα είτε 0,4 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα. Ο ανταγωνιστής ανδρογόνων αναφοράς θα πρέπει να είναι η φλουταμίδη (Flutamide), αριθ. CAS 1311-84-7. Η δοσολογία αναφοράς της φλουταμίδης θα πρέπει να είναι 3 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα και να συγχρησιάζεται με τη δοσολογία αναφοράς της προπιονικής τεστοστερόνης.
39. Συνιστάται, εφόσον είναι δυνατό, να εξετάζεται πρώτα η χρήση υδατικού διαλύματος/εναιωρήματος. Δεδομένου όμως ότι πολλοί συνδέτες ανδρογόνων ή οι μεταβολικοί τους πρόδρομοι είναι συνήθως υδρόφοβοι, η χρήση διαλύματος/εναιωρήματος σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο, φιστικέλαιο, σησαμέλαιο ή ελαιόλαδο) αποτελεί τη συνηθέστερη προσέγγιση. Οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να διαλύονται σε ελάχιστη ποσότητα αιθανόλης 95 % ή άλλου κατάλληλου διαλύτη και τα διαλύματά τους να αραιώνονται στον φορέα της δοκιμής μέχρι τις τελικές συγκεντρώσεις εργασίας. Τα τοξικά χαρακτηριστικά του διαλύτη θα πρέπει να είναι γνωστά και να ελέγχονται σε χωριστή ομάδα μαρτύρων στην οποία χορηγείται μόνο ο διαλύτης. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται σταθερή, μπορεί να χρησιμοποιείται ήπια θέρμανση και έντονη μηχανική δράση για τη διευκόλυνση της διάλυσής της. Θα πρέπει να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα. Εάν αυτή είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, είναι δυνατόν να παρασκευάζεται ένα αρχικό γνωστό κλάσμα του δείγματος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και οι καθορισμένες αραιώσεις δοσολογίας να ετοιμάζονται καθημερινά, με προσοχή ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση και η αλλοίωση των δειγμάτων.

Χορήγηση δόσεων

40. Η προπιονική τεστοστερόνη θα πρέπει να χορηγείται με υποδόρια ένεση, ενώ η φλουταμίδη με στομαχικό καθετήρα.
41. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με στομαχικό καθετήρα ή υποδόρια ένεση. Κατά την επιλογή οδού χορήγησης θα πρέπει να συνεκτιμώνται ζητήματα καλής μεταχείρισης των ζώων και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Επιπλέον, πριν από την έναρξη εκτενούς μακροπρόθεσμης δοκιμής, λόγω θετικού αποτελέσματος με την ένεση, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τοξικολογικές πτυχές, όπως η συνάφεια με την οδό έκθεσης του ανθρώπου στη χημική ουσία (π.χ. στομαχικός καθετήρας για έκθεση μέσω κατάποσης, υποδόρια ένεση για έκθεση μέσω της εισπνοής ή της επιδερμίδας) και τα υφιστάμενα τοξικολογικά στοιχεία και δεδομένα για τον μεταβολισμό και την κινητική (π.χ. ανάγκη αποφυγής του μεταβολισμού πρώτης διόδου, μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μέσω συγκεκριμένης οδού).
42. Οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται στα ζώα κατά τον ίδιο τρόπο και με την ίδια χρονική ακολουθία για δέκα συνεχείς ημέρες κατά διαστήματα περίπου 24 ωρών. Το επίπεδο δοσολογίας πρέπει να ρυθμίζεται καθημερινά, με βάση σύγχρονων καθημερινές μετρήσεις του σωματικού βάρους. Ο όγκος των δόσεων και ο χρόνος χορήγησής τους θα πρέπει να καταγράφονται κάθε ημέρα έκθεσης. Για να είναι δυνατή η ουσιαστική ερμηνεία των δεδομένων, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μη σημειώνεται υπέρβαση της μέγιστης δόσης που αναφέρεται στην παράγραφο 35. Εν προκειμένου, θα πρέπει να αξιολογούνται ενδελεχώς η μείωση του σωματικού βάρους, τα κλινικά σημεία και τα λοιπά ευρήματα. Για τη χορήγηση από το στόμα θα πρέπει να χρησιμοποιείται στομαχικός καθετήρας ή κατάλληλη διασωλήνωση. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί εράπαξ εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου. Θα πρέπει να εφαρμόζονται οι τοπικές κατευθυντήριες γραμμές για τη φροντίδα των ζώων, αλλά ο όγκος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 5 ml/kg σωματικού βάρους, εξαιρουμένων των υδατικών διαλυμάτων, στην περίπτωση των οποίων μπορούν να χρησιμοποιούνται 10 ml/kg σωματικού βάρους. Όσον αφορά τις υποδόριες ενέσεις, οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται στη ραχιαία περιοχή της ωμοπλάτης και/ή στην οσφυϊκή περιοχή με αποστειρωμένη βελόνα (π.χ. διαμετρήματος 23 ή 25) και σύριγγα φυματινής. Το ξύρισμα του σημείου ένεσης είναι προαιρετικό. Θα πρέπει να καταγράφονται τυχόν απώλειες, διαρροή στο σημείο ένεσης ή ελλιπής χορήγηση. Ο συνολικός όγκος που χορηγείται με ένεση ανά επίμυ ανά ημέρα δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 0,5 ml/kg σωματικού βάρους.

Ειδικές διαδικασίες για τους αγωνιστές ανδρογόνων

43. Στη δοκιμή αγωνιστών των ανδρογόνων, η ομάδα στην οποία χορηγείται ο φορέας αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η ομάδα στην οποία χορηγείται προπιονική τεστοστερόνη αποτελεί τον θετικό μάρτυρα. Η βιολογική δράση που αντιστοιχεί σε αγωνιστές ανδρογόνων ελέγχεται με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε ομάδες αγωγής στις επιλεγμένες δόσεις για 10 συνεχείς ημέρες. Το βάρος των πέντε επικουρικών γεννητικών ιστών στις ομάδες αγωγής με την ελεγχόμενη χημική ουσία συγκρίνεται με το αντίστοιχο βάρος στις ομάδες που λαμβάνουν τον φορέα για να διαπιστωθούν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις του βάρους.

Ειδικές διαδικασίες για τους ανταγωνιστές ανδρογόνων και τους αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης

44. Στη δοκιμή ανταγωνιστών των ανδρογόνων και αναστολέων της 5α-ρεδουκτάσης, η ομάδα στην οποία χορηγείται προπιονική τεστοστερόνη αποτελεί τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ η ομάδα στην οποία συγχρηγούνται δόσεις αναφοράς προπιονικής τεστοστερόνης και φλουταμίδης αποτελεί τον θετικό μάρτυρα. Η βιολογική δράση που αντιστοιχεί σε ανταγωνιστές ανδρογόνων και αναστολείς της 5α-ρεδουκτάσης ελέγχεται με τη χορήγηση δόσης αναφοράς προπιονικής τεστοστερόνης, καθώς και της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, για 10 συνεχείς ημέρες. Το βάρος των πέντε επικουρικών γεννητικών ιστών στις ομάδες στις οποίες χορηγείται προπιονική τεστοστερόνη και η ελεγχόμενη χημική ουσία συγκρίνεται με το αντίστοιχο βάρος στις ομάδες που λαμβάνουν μόνο δόσεις αναφοράς προπιονικής τεστοστερόνης για να διαπιστωθούν στατιστικά σημαντικές μειώσεις του βάρους.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**Κλινικές παρατηρήσεις**

45. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μία φορά ημερησίως και συχνότερα όταν παρατηρούνται σημεία τοξικότητας. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται κατά προτίμηση την (τις) ίδια(-ες) ώρα(-ες) κάθε μέρα και λαμβανομένου υπόψη του χρόνου των αναμενόμενων μέγιστων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Θα πρέπει να παρατηρούνται όλα τα ζώα για θνησιμότητα, νοσηρότητα και γενικά κλινικά σημεία, όπως αλλαγές στη συμπεριφορά, το δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής).
46. Κάθε ζώο που βρίσκεται νεκρό θα πρέπει να απομακρύνεται και να απορρίπτεται χωρίς περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων. Τυχόν θνησιμότητα ζώων πριν από τη νεκροψία, καθώς και οι προφανείς αιτίες της, θα πρέπει να καταγράφονται στο πρακτικό της μελέτης. Τα ετοιμοθάνατα ζώα θα πρέπει να θανατώνονται ανώδυνα. Τα ετοιμοθάνατα ζώα που υποβάλλονται σε ευθανασία, καθώς και οι προφανείς αιτίες της νοσηρότητάς τους, θα πρέπει να καταγράφονται στο πρακτικό της μελέτης.

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής

47. Όλα τα ζώα θα πρέπει να ζυγίζονται καθημερινά με ακρίβεια 0,1 g, για πρώτη φορά ακριβώς πριν από την έναρξη της αγωγής, δηλ. όταν κατανέμονται στις ομάδες. Προαιρετικά, μπορεί να μετράται η ποσότητα τροφής που καταναλώνεται κατά την περίοδο αγωγής ανά κλωβό, με ζύγιση των διατάξεων τροφοδοσίας. Τα αποτελέσματα που αφορούν την κατανάλωση τροφής θα πρέπει να εκφράζονται σε γραμμάρια ανά επίμυ ανά ημέρα.

Ανατομή και μέτρηση του βάρους των ιστών και των οργάνων

48. Περίπου 24 ώρες μετά την τελευταία χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, οι επίμυες θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία και αφαιμάξη, σύμφωνα με τις συνήθεις διαδικασίες του εργαστηρίου που διεξάγει τη δοκιμή, και να νεκροτομούνται. Η μέθοδος ευθανασίας θα πρέπει να καταγράφεται στην έκθεση του εργαστηρίου.
49. Σε ιδανικές συνθήκες, η σειρά νεκροψίας θα πρέπει να τυχαιοποιείται μεταξύ των ομάδων, ώστε να αποφεύγεται η πρόοδος κατά τη σειρά των ομάδων δόσης, ανοδικά ή καθοδικά, που θα μπορούσε να επηρεάσει τα δεδομένα. Όλα τα ευρήματα της νεκροψίας, π.χ. παθολογικές αλλαγές/ορατές αλλοιώσεις, θα πρέπει να σημειώνονται και να αναφέρονται.
50. Θα πρέπει να ζυγίζονται οι πέντε ανδρογονοεξαρτώμενοι ιστοί (κοιλιακός λοβός του προστάτη, σπερματοδόχοι κύστες, ανελκτικές του πρωκτού και βολβοσηραγγώδεις μύες, βολβοουρηθρικοί αδένες, βάλανος του πέους). Οι ιστοί αυτοί εκτέμνονται, απαλλάσσονται από την περίσσεια προσκολλημένων ιστών και λίπους και προσδιορίζεται το βάρος τους σε νωπή κατάσταση (χωρίς μονιμοποίηση). Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή κατά τον χειρισμό κάθε ιστού ώστε να αποφεύγεται η απώλεια υγρών και η ξήρανση, η οποία ενδέχεται να προκαλέσει σημαντικά σφάλματα και μεταβλητότητα, μειώνοντας

το καταγραφόμενο βάρος. Ορισμένοι από τους ιστούς μπορεί να είναι πολύ μικροί ή να ανατέμνονται με δυσκολία, γεγονός που συνεπάγεται μεταβλητότητα. Είναι επομένως σημαντικό τα άτομα που ανατέμνουν τους επικουρικούς γεννητικούς ιστούς να είναι εξοικειωμένα με τις τυποποιημένες διαδικασίες ανατομής των ιστών αυτών. Ένα εγχειρίδιο τυποποιημένης διαδικασίας λειτουργίας (SOP) σχετικά με την ανατομή είναι διαθέσιμο από τον ΟΟΣΑ (21). Η επιμελής κατάρτιση του προσωπικού σύμφωνα με τον οδηγό SOP ελαχιστοποιεί μια δυνητική πηγή μεταβλητότητας στη μελέτη. Σε ιδανικές συνθήκες, ο ίδιος παθολογοανατόμος θα πρέπει να είναι υπεύθυνος για την ανατομή ενός δεδομένου ιστού, ώστε να μην υπάρχουν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών λόγω διαφορετικών προσώπων. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, η νεκροψία θα πρέπει να σχεδιάζεται κατά τρόπο ώστε κάθε παθολογοανατόμος να ανατέμνει ένα δεδομένο ιστό από όλες τις ομάδες αγωγής και όχι ένα άτομο να ανατέμνει όλους τους ιστούς από μια ομάδα μαρτύρων, ενώ ένα άλλο είναι υπεύθυνο για τις ομάδες αγωγής. Κάθε επικουρικός γεννητικός ιστός θα πρέπει να ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg, χωρίς να προηγείται στύπωση, και το βάρος του να καταγράφεται για κάθε ζώο.

51. Ορισμένοι από τους ιστούς μπορεί να είναι πολύ μικροί ή να ανατέμνονται με δυσκολία, γεγονός που συνεπάγεται μεταβλητότητα. Από προγενέστερες εργασίες προέκυψε ένα εύρος συντελεστών μεταβλητότητας (CV) που φαίνεται να διαφέρει ανάλογα με την ικανότητα του εργαστηρίου. Σε λίγες περιπτώσεις, έχουν παρατηρηθεί μεγάλες διαφορές εντός συγκεκριμένου εργαστηρίου στο απόλυτο βάρος ιστών όπως ο κοιλιακός λοβός του προστάτη και οι βολβοουρηθρικοί αδένες.
52. Η μέτρηση του βάρους του ήπατος, του ζεύγους των νεφρών και του ζεύγους των επινεφριδίων είναι προαιρετική. Θα πρέπει, και στην περίπτωση αυτή, να απαλλάσσονται οι ιστοί από τυχόν προσκολλημένη περιτόνια και λίπος. Το ήπαρ θα πρέπει να ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 g και το βάρος του να καταγράφεται με την ίδια ακρίβεια και τα ζεύγη των νεφρών και των επινεφριδίων θα πρέπει να ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg και το βάρος τους να καταγράφεται με την ίδια ακρίβεια. Το ήπαρ, οι νεφροί και τα επινεφρίδια δεν επηρεάζονται απλώς μόνο από τα ανδρογόνα, αλλά παρέχουν και χρήσιμες ενδείξεις συστημικής τοξικότητας.
53. Η μέτρηση της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH), της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH) και της τεστοστερόνης στον ορό του αίματος είναι προαιρετική. Τα επίπεδα της τεστοστερόνης ορού είναι χρήσιμα προκειμένου να διαπιστωθεί αν η ελεγχόμενη χημική ουσία επάγει μεταβολισμό της τεστοστερόνης στο ήπαρ, μειώνοντας τα επίπεδά της στον ορό. Εάν δεν υπάρχουν δεδομένα για την τεστοστερόνη, αυτή η επίδραση θα μπορούσε να αποδοθεί σε αντιανδρογονικό μηχανισμό. Τα επίπεδα της LH παρέχουν πληροφορίες για την ικανότητα ενός αντιανδρογόνου όχι μόνο να μειώνει το βάρος οργάνων, αλλά και να επηρεάζει τη λειτουργία του υποθαλάμου και της υπόφυσης, επίδραση που μπορεί να επάγει όγκους των όρχεων σε μακροπρόθεσμες μελέτες. Η FSH είναι ορμόνη σημαντική για τη σπερματογένεση. Προαιρετικές είναι και οι μετρήσεις της θυροξίνης ορού (T4) και της τριωδοθυρονίνης ορού (T3), που παρέχουν χρήσιμες συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα διατάραξης της ομοιόστασης των θυρεοειδικών ορμονών. Εάν πρόκειται να γίνουν μετρήσεις ορμονών, θα πρέπει να αναισθητοποιούνται οι επίμυες πριν από τη νεκροψία και να λαμβάνονται δείγματα αίματος με παρακέντηση της καρδιάς. Η μέθοδος αναισθησίας θα πρέπει να επιλέγεται με προσοχή ώστε να μην επηρεάζει τη μέτρηση των ορμονών. Θα πρέπει να καταγράφονται η μέθοδος προετοιμασίας του ορού, η προέλευση των συνόλων αντιδραστηρίων (kit) ραδιοανοσοχημικού προσδιορισμού ή άλλων μετρήσεων, οι διαδικασίες ανάλυσης και τα αποτελέσματα. Τα επίπεδα της LH και της τεστοστερόνης θα πρέπει να αναφέρονται σε ng ανά ml ορού.
54. Η ανατομή των ιστών περιγράφεται κατωτέρω, ενώ λεπτομερής οδηγός ανατομής με φωτογραφίες έχει δημοσιευθεί ως συμπληρωματικό υλικό στο πλαίσιο του προγράμματος επικύρωσης (21). Διατίθεται επίσης ένα βίντεο ανατομής στην ιστοσελίδα της Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων της Κορέας (22).
 - Με το ζώο σε ύπτια θέση, προσδιορίζεται αν η πόσθη του πέους έχει διαχωριστεί από τη βάλανο. Εάν έχει, συμπύσσεται η ακροποσθία και αφαιρείται η βάλανος του πέους, η οποία ζυγίζεται (με ακρίβεια 0,1 mg) και το βάρος της καταγράφεται.
 - Διανοίγονται το δέρμα της κοιλιάς και το κοιλιακό τοίχωμα, ώστε να αποκαλυφθούν τα σπλάχνα. Εάν προβλέπεται ζύγιση προαιρετικών οργάνων, αφαιρείται το ήπαρ και ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 g, αφαιρούνται το στομάχι και τα έντερα, αφαιρούνται οι νεφροί και τα επινεφρίδια και ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg. Με την ανατομή αυτή αποκαλύπτεται η ουροδόχος κύστη και αρχίζει η ανατομή των επικουρικών γεννητικών ιστών-στόχων των αρσενικών ζώων.
 - Για την ανατομή του κοιλιακού λοβού του προστάτη, διαχωρίζεται η ουροδόχος κύστη από το μυϊκό στρώμα της κοιλιάς, με τομή του συνδετικού ιστού κατά μήκος της μέσης γραμμής. Μετατοπίζεται η ουροδόχος κύστη προς τα εμπρός, προς τις σπερματοδόχους κύστες, αποκαλύπτοντας τον αριστερό και τον δεξιό κοιλιακό λοβό του προστάτη (που καλύπτονται από στρώμα λίπους). Αφαιρείται προσεκτικά το λίπος από τον δεξιό και τον αριστερό κοιλιακό λοβό του προστάτη. Απομακρύνεται με απαλές κινήσεις ο δεξιός κοιλιακός λοβός του προστάτη από την ουρήθρα και αποκόπτεται από αυτήν. Χωρίς να αφεί ο δεξιός κοιλιακός λοβός του προστάτη, απομακρύνεται με απαλές κινήσεις ο αριστερός κοιλιακός λοβός του προστάτη από την ουρήθρα και αποκόπτεται. Οι λοβοί ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg και το βάρος τους καταγράφεται.
 - Για την ανατομή των σπερματοδόχων κύστεων και των πηκτοειδών αδένων, μετατοπίζεται η ουροδόχος κύστη προς την ουρά, αποκαλύπτοντας τον σπερματικό πόρο και τον δεξιό και τον αριστερό λοβό των σπερματοδόχων κύστεων και των πηκτοειδών αδένων. Προλαμβάνεται η διαρροή υγρών με τη χρήση αιμοστατικής λαβίδας στη βάση των σπερματοδόχων κύστεων και των πηκτοειδών αδένων, στο σημείο όπου ο σπερματικός πόρος συνδέεται με την ουρήθρα. Ανατέμνονται προσεκτικά οι σπερματοδόχοι κύστες και οι πηκτοειδείς αδένες και, με την αιμοστατική λαβίδα στη θέση της, απαλλάσσονται από το λίπος και τα εξαρτήματά τους, τοποθετούνται σε προζυγισμένο σκαφίδιο ζύγισης, αφαιρείται η αιμοστατική λαβίδα, ζυγίζονται με ακρίβεια 0,1 mg και καταγράφεται το βάρος τους.

- Για την ανατομή των ανελκτήρων του πρωκτού και των βολβοσηραγγωδών μυών αποκαλύπτονται οι μύες και η βάση του πέους. Οι ανελκτήρες του πρωκτού περιβάλλουν το κόλον, ενώ οι πρόσθιοι ανελκτήρες του πρωκτού και οι βολβοσηραγγώδεις μύες είναι συνδεδεμένοι με τους βολβούς του πέους. Αφαιρούνται το δέρμα και τα εξαρτήματα από την περιπρωκτική περιοχή, που εκτείνεται από τη βάση του πέους έως το πρόσθιο άκρο του πρωκτού. Αποκόπτονται σταδιακά οι βολβοσηραγγώδεις μύες από τον βολβό και τους ιστούς του πέους. Αφού τεμαχιστεί το κόλον στη μέση, μπορεί να αποκοπεί και να αφαιρεθεί ολόκληρο το σύμπλεγμα των ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγγωδών μυών. Το σύμπλεγμα αυτό απαλλάσσεται από το λίπος και τα εξαρτήματα, ζυγίζεται με ακρίβεια 0,1 mg και το βάρος του καταγράφεται.
 - Μετά την αφαίρεση των ανελκτήρων του πρωκτού και των βολβοσηραγγωδών μυών, οι στρογγυλοί βολβοουρηθραίοι αδένες ή αδένες του Cowper είναι ορατοί στη βάση των βολβών του πέους, ελαφρώς προς τη ράχη. Απαιτείται προσοχή κατά την ανατομή για να μην προκληθεί εντομή στη λεπτή κάψα και διαρροή υγρών. Ζυγίζεται το ζεύγος των βολβοουρηθραίων αδένων με ακρίβεια 0,1 mg και καταγράφεται το βάρος τους.
 - Επιπλέον, θα πρέπει να καταγράφεται κάθε απώλεια υγρού από αδένες κατά τη νεκροψία και την ανατομή.
55. Εάν για την αξιολόγηση καθέμιας από τις χημικές ουσίες απαιτείται νεκροψία μεγαλύτερου αριθμού ζώων από τον εύλογο ημερήσιο αριθμό, η έναρξη της μελέτης μπορεί να κλιμακωθεί σε δύο συνεχείς ημέρες, με αποτέλεσμα την κλιμάκωση της νεκροψίας και των σχετικών εργασιών σε δύο ημέρες. Σε περίπτωση κλιμάκωσης κατ' αυτόν τον τρόπο, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ανά ημέρα τα μισά ζώα κάθε ομάδας αγωγής.
56. Μετά τη νεκροψία, τα πτώματα θα πρέπει να απορρίπτονται καταλλήλως.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

57. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για κάθε ζώο (σωματικό βάρος, βάρος των επικουρικών γεννητικών ιστών, προαιρετικές μετρήσεις και άλλες αντιδράσεις και παρατηρήσεις) και για κάθε ομάδα ζώων (μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις όλων των μετρήσεων). Τα εν λόγω δεδομένα θα πρέπει να συγκεφαλαιώνονται με τη μορφή πίνακα και να περιλαμβάνουν τον αριθμό των ζώων στην αρχή της δοκιμής, τον αριθμό των ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή εμφάνισαν σημεία τοξικότητας, καθώς και περιγραφή των παρατηρηθέντων σημείων τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας και της σοβαρότητάς τους.
58. Η τελική έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει τα εξής:

Εγκαταστάσεις δοκιμών

- όνομα και γεωγραφική θέση των εγκαταστάσεων·
- διευθυντής και λοιπό προσωπικό της μελέτης και οι αρμοδιότητές τους στη μελέτη·
- ημερομηνίες έναρξης και λήξης της μελέτης, ήτοι πρώτη ημέρα χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και τελευταία ημέρα νεκροψίας, αντιστοίχως.

Ελεγχόμενη χημική ουσία

- προέλευση, αριθμός παρτίδας, ταυτότητα, καθαρότητα, πλήρης διεύθυνση του προμηθευτή και χαρακτηρισμός των ελεγχόμενων χημικών ουσιών·
- φυσική μορφή και, εφόσον έχουν σημασία, φυσικοχημικές ιδιότητες·
- συνθήκες αποθήκευσης και μέθοδος και συχνότητα αραιώσεων·
- τυχόν δεδομένα που προέκυψαν σχετικά με τη σταθερότητα·
- τυχόν αναλύσεις των διαλυμάτων/εναιωρημάτων δόσης.

Φορέας

- χαρακτηρισμός του φορέα (ταυτότητα, προμηθευτής και αριθμός παρτίδας)·
- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα (εάν δεν πρόκειται για νερό).

Πειραματόζωα και ζωοκομικές διαδικασίες

- χρησιμοποιούμενο είδος/στέλεχος και αιτιολόγηση της επιλογής του/της·
- προέλευση ή προμηθευτής των ζώων, με πλήρη διεύθυνση·
- αριθμός και ηλικία των αγορασθέντων ζώων·

- συνθήκες στέγασης (θερμοκρασία, φωτισμός κ.λπ.)·
- τροφή (όνομα, τύπος, προμηθευτής, αριθμός παρτίδας, περιεχόμενο και επίπεδα φυτοοιστρογόνων, εάν είναι γνωστά)·
- στρωμή (όνομα, τύπος, προμηθευτής, περιεχόμενο)·
- συνθήκες στέγασης σε κλωβούς και αριθμός ζώων ανά κλωβό.

Συνθήκες προσδιορισμού

- ηλικία κατά τον ευνουχισμό και περίοδος εγκλιματισμού μετά τον ευνουχισμό·
- ατομικό βάρος των ζώων κατά την έναρξη της μελέτης (με ακρίβεια 0,1 g)·
- διαδικασία τυχαιοποίησης και καταγραφή της ένταξης στις ομάδες του φορέα, της ουσίας αναφοράς και της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, καθώς και στους κλωβούς·
- μέση τιμή και τυπική απόκλιση σωματικού βάρους ανά ομάδα και ανά ημέρα ζύγισης, καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης·
- αιτιολόγηση της επιλογής των δόσεων·
- οδός χορήγησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και αιτιολόγηση της επιλογής της·
- στην περίπτωση του προσδιορισμού αντιανδρογονικότητας, αγωγή με προπιονική τεστοστερόνη (δόση και όγκος)·
- αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία (δόση και όγκος)·
- χρόνος χορήγησης των δόσεων·
- διαδικασίες νεκροψίας, συμπεριλαμβανομένων των μέσων αφαίμαξης και της ενδεχόμενης αναισθησίας.
- Εάν εκτελούνται αναλύσεις ορού, θα πρέπει να παρέχονται λεπτομέρειες σχετικά με τη μέθοδο. Παραδείγματος χάριν, εάν χρησιμοποιείται ραδιοανοσοχημικός προσδιορισμός (RIA), θα πρέπει να αναφέρονται η διαδικασία RIA, η προέλευση των συνόλων αντιδραστηρίων (κιτ) RIA, οι ημερομηνίες λήξης των κιτ, η διαδικασία απαρίθμησης σπινθηρισμών και η τυποποίηση.

Αποτελέσματα

- καθημερινές παρατηρήσεις κατά τη χορήγηση των δόσεων, για κάθε ζώο, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα εξής:
- σωματικό βάρος (με ακρίβεια 0,1 g),
- κλινικά σημεία (εάν υπήρξαν),
- τυχόν μετρήσεις ή σημειώσεις σχετικά με την κατανάλωση τροφής·
- παρατηρήσεις σχετικά με τη νεκροψία, για κάθε ζώο, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται τα εξής:
- ημερομηνία νεκροψίας,
- ομάδα αγωγής του ζώου,
- αναγνωριστικό του ζώου,
- παθολογοανατόμος,
- ώρα διενέργειας της νεκροψίας και της ανατομής,
- ηλικία του ζώου,
- τελικό σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία, με σημείωση κάθε στατιστικά σημαντικής αύξησης ή μείωσης,
- σειρά αφαίμαξης και ανατομής του ζώου κατά τη νεκροψία,
- βάρος των πέντε ανδρογονοεξαρτώμενων ιστών-στόχων:
- κοιλιακός λοβός του προστάτη (με ακρίβεια 0,1 mg)
- σπερματοδόχοι κύστες και ηκτοειδείς αδένες, μαζί με το υγρό (σε ζεύγη, με ακρίβεια 0,1 mg)
- σύμπλεγμα ανελκτήρων του πρωκτού και βολβοσηραγωγών μυών (με ακρίβεια 0,1 mg)
- βολβοουρηθρικοί αδένες (βάρος σε νωπή κατάσταση, σε ζεύγος, με ακρίβεια 0,1 mg)
- βάλανος του πέους (βάρος σε νωπή κατάσταση, με ακρίβεια 0,1 mg),

- βάρος προαιρετικών ιστών, εάν έχει μετρηθεί:
- ήπαρ (με ακρίβεια 0,1 g)
- νεφροί (σε ζεύγος, με ακρίβεια 0,1 mg)
- επινεφρίδια (σε ζεύγος, με ακρίβεια 0,1 mg),
- γενικές παρατηρήσεις και σχόλια:
- αναλύσεις ορμονών ορού, εάν έχουν εκτελεστεί:
 - LH ορού (προαιρετικά — ng ανά ml ορού) και
 - τεστοστερόνη ορού (προαιρετικά — ng ανά ml ορού),
- γενικές παρατηρήσεις και σχόλια.

Σύνοψη δεδομένων

Τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε μορφή πίνακα που περιέχει το μέγεθος του δείγματος για κάθε ομάδα, τη μέση τιμή και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής ή την τυπική απόκλιση. Οι πίνακες θα πρέπει να περιλαμβάνουν το σωματικό βάρος κατά τη νεκροψία, τις μεταβολές του από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων έως τη νεκροψία, το βάρος των επικουρικών γεννητικών ιστών-στόχων και, ενδεχομένως, το προαιρετικά μετρούμενο βάρος οργάνων.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Ανάλυση των αποτελεσμάτων

59. Το βάρος του σώματος και των οργάνων κατά τη νεκροψία θα πρέπει να υποβάλλεται σε στατιστική ανάλυση όσον αφορά χαρακτηριστικά όπως η ομοιογένεια της διασποράς, με κατάλληλους μετασχηματισμούς δεδομένων, εφόσον είναι αναγκαίοι. Οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να συγκρίνονται με ομάδα μαρτύρων, με τη χρήση τεχνικών όπως η ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA), ακολουθούμενη από συγκρίσεις κατά ζεύγη (π.χ. μονόπλευρη δοκιμασία Dunnett), και του κριτηρίου της στατιστικής διαφοράς, π.χ. $p \leq 0,05$. Θα πρέπει να προσδιορίζονται οι ομάδες που αποκτούν στατιστική σημαντικότητα. Ωστόσο, οι τιμές “σχετικού βάρους οργάνων” θα πρέπει να αποφεύγονται, λόγω του ότι δεν είναι έγκυρες οι στατιστικές παραδοχές στις οποίες βασίζεται ο συγκεκριμένος χειρισμός των δεδομένων.
60. Στην περίπτωση της δράσης αγωνιστών των ανδρογόνων, ο μάρτυρας θα πρέπει να είναι η ομάδα δοκιμής στην οποία χορηγείται μόνο ο φορέας. Τα χαρακτηριστικά του τρόπου δράσης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές σχετικές αντιδράσεις μεταξύ των ιστών: παραδείγματος χάριν, η τρενβολόνη, η οποία δεν μπορεί να αναχθεί μέσω της 5 α -ρεδουκτάσης, έχει εντονότερες επιδράσεις στο σύμπλεγμα των ανελκτρίων του πρωκτού και βολβοσπαραγγώνων μυών και στη βάλανο του πέους σε σύγκριση με την προπιονική τεστοστερόνη. Μια στατιστικά σημαντικά αύξηση ($p \leq 0,05$) του βάρους δύο ή περισσότερων από τους πέντε ανδρογονοεξαρτώμενους ιστούς-στόχους (κοιλιακός λοβός του προστάτη, ανελκτήρες του πρωκτού και βολβοσπαραγγώδεις μυς, βάλανος του πέους, βολβοουρηθραίοι αδένες και σπερματοδόχο κύστης με τους πηκτοειδείς αδένες), αδιακρίτως, θα πρέπει να θεωρείται θετικό αποτέλεσμα αγωνιστή ανδρογόνων, ενώ όλοι οι ιστοί-στόχοι θα πρέπει να εμφανίζουν αυξημένη σε κάποιο βαθμό ανάπτυξη. Η συνδυασμένη αξιολόγηση των αντιδράσεων όλων των ιστών επικουρικών γεννητικών αδένων μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη πολυπαραμετρική ανάλυση. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η ανάλυση, ιδίως σε περιπτώσεις όπου στατιστικά σημαντική αντίδραση παρουσιάζει μόνο ένας ιστός.
61. Στην περίπτωση της δράσης ανταγωνιστών των ανδρογόνων, ο μάρτυρας θα πρέπει να είναι η ομάδα δοκιμής στην οποία χορηγείται το ανδρογόνο αναφοράς (μόνο προπιονική τεστοστερόνη). Τα χαρακτηριστικά του τρόπου δράσης μιας ελεγχόμενης χημικής ουσίας μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικές σχετικές αντιδράσεις μεταξύ των ιστών: παραδείγματος χάριν, οι αναστολείς της 5 α -ρεδουκτάσης, όπως η φιναστερίδη, έχουν εντονότερες επιδράσεις στον κοιλιακό λοβό του προστάτη από ό,τι σε άλλους ιστούς, σε σύγκριση με ισχυρούς ανταγωνιστές υποδοχέων ανδρογόνων, όπως η φλουταμίδα. Μια στατιστικά σημαντικά μείωση ($p \leq 0,05$) του βάρους δύο ή περισσότερων από τους πέντε ανδρογονοεξαρτώμενους ιστούς-στόχους (κοιλιακός λοβός του προστάτη, ανελκτήρες του πρωκτού και βολβοσπαραγγώδεις μυς, βάλανος του πέους, βολβοουρηθραίοι αδένες και σπερματοδόχο κύστης με πηκτοειδείς αδένες) αδιακρίτως, σε σχέση με την αγωγή μόνο με προπιονική τεστοστερόνη, θα πρέπει να θεωρείται θετικό αποτέλεσμα ανταγωνιστή ανδρογόνων, ενώ όλοι οι ιστοί-στόχοι θα πρέπει να εμφανίζουν μειωμένη σε κάποιο βαθμό ανάπτυξη. Η συνδυασμένη αξιολόγηση των αντιδράσεων όλων των ιστών επικουρικών γεννητικών αδένων μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλη πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων. Με τον τρόπο αυτό βελτιώνεται η ανάλυση, ιδίως σε περιπτώσεις όπου στατιστικά σημαντική αντίδραση παρουσιάζει μόνο ένας ιστός.
62. Τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται σε μορφή πίνακα που περιέχει τη μέση τιμή, το τυπικό σφάλμα SE της μέσης τιμής (η τυπική απόκλιση SD είναι επίσης αποδεκτή) και το μέγεθος δείγματος για κάθε ομάδα. Θα πρέπει να περιλαμβάνονται επίσης πίνακες με ατομικά δεδομένα. Οι επιμέρους τιμές, η μέση τιμή και οι τιμές SE (SD) και CV για τα δεδομένα που αφορούν τον μάρτυρα θα πρέπει να εξετάζονται για να διαπιστώνεται αν πληρούν αποδεκτά κριτήρια συμφωνίας με τις αναμενόμενες ιστορικές τιμές. Οι CV που υπερβαίνουν τις τιμές CV του πίνακα 1 (βλ. παραγράφους 25 και 26) για το βάρος κάθε οργάνου θα πρέπει να κρίνουν το κατά πόσον υπάρχουν σφάλματα στην καταγραφή ή την ηλεκτρονική καταχώριση των δεδομένων ή το εργαστήριο δεν έχει ακόμη αποκτήσει την ικανότητα να ανατέμνει με ακρίβεια τους ανδρογονοεξαρτώμενους ιστούς και χρειάζεται περαιτέρω κατάρτιση/εξάσκηση. Γενικά, οι CV (πηλίκο της τυπικής απόκλισης δια του μέσου βάρους οργάνου) είναι αναπαραγώγιμοι μεταξύ εργαστηρίων και μεταξύ μελετών. Τα δεδομένα

που παρουσιάζονται θα πρέπει να περιλαμβάνουν τουλάχιστον το βάρος του κοιλιακού λοβού του προστάτη, των σπερματοδόχων κύστεων, των ανελκτήρων του πρωκτού και των βολβοσηραγωγδών μυών, των βολβοουρηθραίων αδένων, της βάλανου του πέους και του ήπατος, καθώς και το σωματικό βάρος και τη μεταβολή του από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων έως τη νεκροψία. Είναι επίσης δυνατόν να παρουσιάζονται τα δεδομένα μετά από προσαρμογή συμμεταβλητής για να ληφθεί υπόψη το σωματικό βάρος, αλλά η παρουσίαση αυτή δεν πρέπει να αντικαθιστά την παρουσίαση των μη προσαρμοσμένων δεδομένων. Επιπλέον, εάν σε οποιαδήποτε από τις ομάδες δεν έχει διαχωριστεί η πόσθη, θα πρέπει να καταγράφεται η συχνότητα εμφάνισης (επίπτωση) της κατάστασης αυτής και να συγκρίνεται στατιστικά με την ομάδα μαρτύρων με τη χρήση της δοκιμασίας Fisher Exact.

63. Κατά τον έλεγχο της ακρίβειας των δεδομένων που έχουν καταχωριστεί στον υπολογιστή με παραβολή με τα αρχικά δελτία δεδομένων, οι τιμές βάρους οργάνων που δεν είναι βιολογικά ευλογοφανείς ή διαφέρουν κατά περισσότερες από τρεις τυπικές αποκλίσεις από τις μέσες τιμές της οικείας ομάδας αγωγής θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή και, ενδεχομένως, να απορρίπτονται, καθώς πρόκειται μάλλον για σφάλματα καταγραφής.
64. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων της μελέτης με τις τιμές CV του ΟΟΣΑ (πίνακας 1) αποτελεί συχνά σημαντικό στάδιο της ερμηνείας, όσον αφορά την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων της μελέτης. Τα εργαστήρια θα πρέπει να διατηρούν ιστορικά δεδομένα, αφενός για τις ομάδες μαρτύρων με τον φορέα και, αφετέρου, για τις αντιδράσεις σε θετικές χημικές ουσίες αναφοράς, όπως η προπιονική τεστοστερόνη και η φλουταμίδη. Τα εργαστήρια μπορούν επίσης να ελέγχουν περιοδικά την αντίδραση σε γνωστούς ασθενείς αγωνιστές και ανταγωνιστές ανδρογόνων και να φυλάσσουν τα σχετικά δεδομένα. Τα δεδομένα αυτά μπορούν να συγκρίνονται με τα διαθέσιμα δεδομένα του ΟΟΣΑ ώστε να διασφαλίζεται ότι οι μέθοδοι του εργαστηρίου παρέχουν επαρκή στατιστική ακρίβεια και ισχύ.

Προσάρτημα 1

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Αντιοιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να καταστέλλει τη δράση της 17β-οιστραδιόλης στον οργανισμό θηλαστικού.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ημερομηνία γέννησης: η μεταγεννητική ημέρα 0.

Δοσολογία: γενικός όρος που περικλείει τη δόση, καθώς και τη συχνότητα και τη διάρκεια χορήγησής της.

Δόση: η χορηγούμενη ποσότητα ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Στον μητροτροφικό βιοπροσδιορισμό, η δόση εκφράζεται ως βάρος της ελεγχόμενης χημικής ουσίας ανά μονάδα σωματικού βάρους του ζώου που υποβάλλεται στη δοκιμή ανά ημέρα (π.χ. mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα).

Μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ): η μέγιστη ποσότητα μιας χημικής ουσίας που, όταν εισαχθεί στο σώμα, δεν προκαλεί τον θάνατο των ζώων της δοκιμής (συμβολίζεται με LD₅₀) (IUPAC, 1993).

Οιστρογονικότητα: η ικανότητα μιας χημικής ουσίας να δρα όπως η 17β-οιστραδιόλη στον οργανισμό θηλαστικού.

Μεταγεννητική ημέρα X: η Χη ημέρα ζωής από την ημερομηνία γέννησης.

Ευαισθησία: το ποσοστό του συνόλου των θετικών/δραστικών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ειδικότητα: το ποσοστό του συνόλου των αρνητικών/αδρανών χημικών ουσιών που ταξινομούνται σωστά με τη δοκιμή. Αποτελεί μέτρο της ορθότητας μιας μεθόδου δοκιμών με την οποία λαμβάνονται κατηγορικά αποτελέσματα, καθώς και σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης της καταλληλότητας μιας μεθόδου δοκιμών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Μητροτροφική: όρος που χρησιμοποιείται για την περιγραφή θετικών επιδράσεων στην ανάπτυξη των ιστών της μήτρας

Επικύρωση: επιστημονική διαδικασία που έχει σχεδιαστεί για τον χαρακτηρισμό των λειτουργικών απαιτήσεων και περιορισμών μιας μεθόδου δοκιμών και για την απόδειξη της αξιοπιστίας της και της καταλληλότητάς της για συγκεκριμένο σκοπό.

Προσάρτημα 2

Σημείωση: Έγγραφο που έχει καταρτιστεί από τη Γραμματεία του Προγράμματος Κατευθυντήριων Γραμμών Δοκιμών βάσει της συμφωνίας που επιτεύχθηκε κατά την 6η συνεδρίαση της ειδικής ομάδας για τις δοκιμές και την αξιολόγηση ενδοκρινικών διαταρακτών (EDTA)

Εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών

<p>1ο επίπεδο Διαλογή και ιεράρχηση βάσει υφιστάμενων πληροφοριών</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Φυσικές & χημικές ιδιότητες, π.χ. μοριακό βάρος, δραστηκότητα, πιητικότητα, βιοαποικοδομησιμότητα — Έκθεση του ανθρώπου και του περιβάλλοντος, π.χ. όγκος παραγωγής, ελευθέρωση, μοντέλα χρήσης — Κίνδυνος, π.χ. διαθέσιμα τοξικολογικά δεδομένα 	
<p>2ο επίπεδο Προδιορισμοί in vitro που παρέχουν μηχανιστικά δεδομένα</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Συγγένεια σύνδεσης με υποδοχείς ER, AR, TR — Μεταγραφική ενεργοποίηση — Αρωματάση και στεροειδογένεση in vitro — Αναγνώριση υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων/σύνδεση με αυτόν — Μοντέλα QSAR (ποσοτική σχέση δομής-δραστηκότητας) — Προδιαλογή υψηλής ταχύτητας ανάλυσης — Λειτουργία του θυρεοειδούς — Προδιορισμός βιτελλογενίνης σε ηπατοκύτταρα ιχθύων — Άλλοι (κατά περίπτωση) 	
<p>3ο επίπεδο Προδιορισμοί in vivo που παρέχουν δεδομένα για μεμονωμένους ενδοκρινικούς μηχανισμούς και επιδράσεις</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Μητροτροφικός προσδιορισμός (οιστρογόνα) — Προδιορισμός Hershberger (ανδρογόνα) — Λειτουργία ορμονών χωρίς τη μεσολάβηση υποδοχέα — Άλλοι (π.χ. θυρεοειδικοί) 	<ul style="list-style-type: none"> — Προδιορισμός VTG (βιτελλογενίνη) σε ιχθύες (οιστρογόνα)
<p>4ο επίπεδο Προδιορισμοί in vivo που παρέχουν δεδομένα για πολλαπλούς ενδοκρινικούς μηχανισμούς και επιδράσεις</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή αριθ. 407 του ΟΟΣΑ (καταληκτικά σημεία βάσει ενδοκρινικών μηχανισμών) — Προδιορισμοί σε αρσενικά και θηλυκά ζώα στην ήβη — Προδιορισμός σε ενήλικα άθικτα αρσενικά 	<ul style="list-style-type: none"> — Ιστοπαθολογικός προσδιορισμός σε γονάδες χιθύνων — Προδιορισμός μεταμόρφωσης σε βατράχους
<p>5ο επίπεδο Προδιορισμοί in vivo που παρέχουν δεδομένα για τις επιδράσεις ενδοκρινικών και άλλων μηχανισμών</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Προδιορισμός μίας γενεάς (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 415)¹ — Προδιορισμός δύο γενεών (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 416)¹ — Δοκιμή αναπαραγωγικής διαλογής (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 421)¹ — Συνδυασμένη δοκιμή 28 ημερών/αναπαραγωγικής διαλογής (βελτιωμένη κατευθυντήρια γραμμή δοκιμών αριθ. 422)¹ <p>¹ Οι ενδεδειγμένες βελτιώσεις στα μελετηθέν από την ομάδα VMG mammi</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Προδιορισμοί μερικού και πλήρους κύκλου ζωής σε ιχθύες, πιτηνά, αμφίβια και ασπόνδυλα (αναπτυξιακοί και αναπαραγωγικοί)

VMG mammi: ομάδα διαχείρισης της επικύρωσης για τις δοκιμές και την αξιολόγηση σε θηλαστικά

ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΝΟΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΛΑΙΣΙΟΥ:

- Σημείωση 1: Η είσοδος και η έξοδος είναι δυνατή σε όλα τα επίπεδα και εξαρτάται από το είδος των υφιστάμενων αναγκών σε πληροφορίες για την εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.
- Σημείωση 2: Στο 5ο επίπεδο, η οικοτοξικολογία θα πρέπει να περιλαμβάνει τελικά σημεία που υποδηλώνουν μηχανισμούς δυσμενών επιδράσεων και δυνητικές βλάβες στον πληθυσμό.
- Σημείωση 3: Όταν ένα πολυτροπικό μοντέλο καλύπτει περισσότερους από έναν προσδιορισμούς με ένα τελικό σημείο, το μοντέλο αυτό θα πρέπει να αντικαθιστά τη χρήση των εν λόγω προσδιορισμών ενός τελικού σημείου.
- Σημείωση 4: Κάθε χημική ουσία θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση, λαμβανομένων υπόψη όλων των διαθέσιμων πληροφοριών και με γνώμονα τη λειτουργία των επιπέδων του πλαισίου.
- Σημείωση 5: Το πλαίσιο δεν θα πρέπει να θεωρείται επί του παρόντος ότι περιλαμβάνει τα πάντα. Στο 3ο, το 4ο και το 5ο επίπεδο, περιλαμβάνει προσδιορισμούς που είτε είναι διαθέσιμοι είτε βρίσκονται στο στάδιο της επικύρωσης. Στη δεύτερη περίπτωση, οι προσδιορισμοί έχουν συμπεριληφθεί προσωρινά. Όταν αναπτυχθούν και επικυρωθούν, θα προστεθούν επισήμως στο πλαίσιο.
- Σημείωση 6: Το 5ο επίπεδο δεν θα πρέπει να θεωρείται ότι περιλαμβάνει μόνο οριστικές δοκιμές. Οι δοκιμές αυτού του επιπέδου θεωρείται ότι συμβάλλουν στη γενική εκτίμηση επικινδυνότητας και κινδύνων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- (3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. In: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- (4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- (5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- (6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- (7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.
- (8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671-8.
- (9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J* 26:413-422.
- (10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J* 26:1306-1314.
- (11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38-44.
- (12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113-119.
- (13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175-180.

- (14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- (15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. In: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.
- (16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.
- (17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.
- (19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- (20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- (21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. Βλ. 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.
- (23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- (24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- (25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
- (26) Οδηγία 2010/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22ας Σεπτεμβρίου 2010, περί προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (ΕΕ L 276 της 20.10.2010, σ. 33).
- (27) Τα ακόλουθα κεφάλαια του παρόντος παρατήματος:
- B.1 α. Οξεία τοξικότητα από το στόμα — Διαδικασία προκαθορισμένων δόσεων
- B.1 β. Οξεία τοξικότητα από το στόμα — Μέθοδος των κλάσεων οξείας τοξικότητας

B.56 ΕΚΤΕΤΑΜΕΝΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΑΣ ΓΕΝΕΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 443 (2012). Βασίζεται στην πρόταση της Τεχνικής Επιτροπής για την Εκτίμηση Ασφάλειας Γεωργικών Χημικών Ουσιών (ACSA), του Διεθνούς Ινστιτούτου Επιστημών Υγείας (International Life Science Institute — ILSI)-του Ινστιτούτου Επιστημών Περιβάλλοντος και Υγείας (Health and Environmental Sciences Institute -HESI) για τη διεξαγωγή εκτεταμένης μελέτης αναπαραγωγής μίας γενεάς στο στάδιο ζωής F₁, η οποία δημοσιεύθηκε από τους Cooper et al., 2006 (1). Έχουν γίνει πολλές βελτιώσεις και διασαφηνίσεις στον σχεδιασμό της μελέτης, ώστε να εξασφαλιστεί ευελιξία και να τονιστεί η σημασία της χρήσης των υφιστάμενων γνώσεων ως αφετηρίας, με παράλληλη παρατήρηση των ζωντανών ζώων για την καθοδήγηση και την προσαρμογή της δοκιμής. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών παρέχει αναλυτική περιγραφή της επιχειρησιακής διεξαγωγής εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς. Περιγράφονται τρεις κοόρτες ζώων πρώτης γενεάς (F₁):

κοόρτη 1: αξιολόγηση τελικών σημείων αναπαραγωγής/ανάπτυξης· η κοόρτη αυτή μπορεί να επεκταθεί ώστε να περιλαμβάνει και τη δεύτερη γενεά (F₂)·

κοόρτη 2: αξιολόγηση των δυνητικών επιπτώσεων της έκθεσης σε χημική ουσία στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα·

κοόρτη 3: αξιολόγηση των δυνητικών επιπτώσεων της έκθεσης σε χημική ουσία στο αναπτυσσόμενο ανοσοποιητικό σύστημα.

2. Οι αποφάσεις σχετικά με την αξιολόγηση της δεύτερης γενεάς και την παράλειψη της κοόρτης αναπτυξιακής νευροτοξικότητας και/ή της κοόρτης αναπτυξιακής ανοσοτοξικότητας θα πρέπει να αντανakλούν τις υφιστάμενες γνώσεις για την αξιολογούμενη χημική ουσία, καθώς και τις ανάγκες των διαφόρων ρυθμιστικών αρχών. Σκοπός της μεθόδου δοκιμών είναι η παροχή λεπτομερών πληροφοριών για τον τρόπο με τον οποίο μπορεί να διεξαχθεί η μελέτη και η κάλυψη του τρόπου με τον οποίο θα πρέπει να αξιολογείται κάθε κοόρτη.
3. Για τις ρυθμιστικές αρχές που χρησιμοποιούν εσωτερικά σημεία ενεργοποίησης, η διαδικασία λήψης αποφάσεων σχετικά με την εσωτερική ενεργοποίηση της παραγωγής της δεύτερης γενεάς περιγράφεται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 117 του ΟΟΣΑ (39).

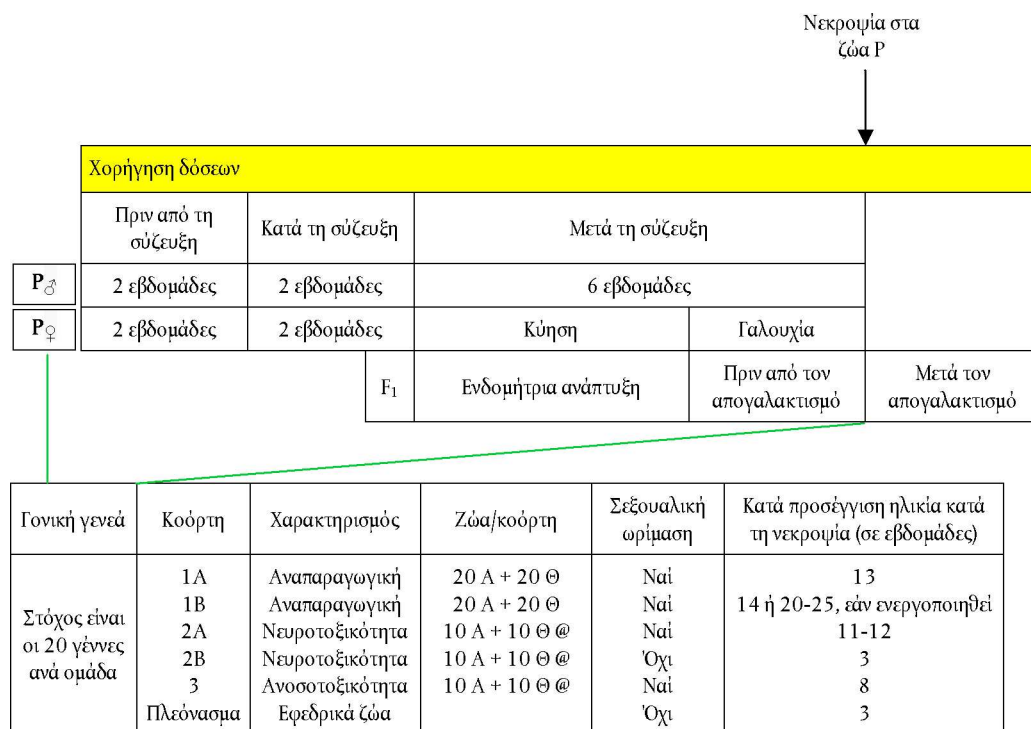
ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

4. Κύριος στόχος της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς είναι η αξιολόγηση συγκεκριμένων σταδίων της ζωής που δεν καλύπτονται από άλλους τύπους μελετών τοξικότητας και ο έλεγχος για τον εντοπισμό επιδράσεων που ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα προγεννητικής και μεταγεννητικής έκθεσης σε χημικές ουσίες. Όσον αφορά τα τελικά σημεία της αναπαραγωγής, προβλέπεται η χρήση, ως πρώτο βήμα και όταν υπάρχουν, πληροφοριών από μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση [συμπεριλαμβανομένων των μελετών διαλογής ως προς την τοξικότητα στην αναπαραγωγή, π.χ. κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή TG 422 (32)] ή από βραχυπρόθεσμους προσδιορισμούς διαλογής ενδοκρινικών διαταρακτών [π.χ. μητροτροφικός προσδιορισμός — μέθοδος δοκιμών B.54 (36) και προσδιορισμός Hershberger — μέθοδος δοκιμών B.55 (37)] για την ανίχνευση επιδράσεων στα αναπαραγωγικά όργανα των αρσενικών και των θηλυκών ζώων. Οι πληροφορίες αυτές είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν τη σπερματογένεση (ιστοπαθολογία των όρχεων) στα αρσενικά ζώα και τον οιστρικό κύκλο, τους αριθμούς ωοθυλακίων/την ωρίμαση των ωοκυττάρων και την αρτιότητα των ωοθηκών (ιστοπαθολογία) στα θηλυκά. Η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς λειτουργεί στη συνέχεια ως δοκιμή για τελικά σημεία της αναπαραγωγής τα οποία απαιτούν αλληλεπίδραση αρσενικών ζώων με θηλυκά, θηλυκών ζώων με το κυοφορούμενο και θηλυκών ζώων με απογόνους και ζώα της γενεάς F_1 έως μετά τη σεξουαλική ωρίμαση [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ που τεκμηριώνει την παρούσα μέθοδο δοκιμών (40)].
5. Η μέθοδος δοκιμών έχει σχεδιαστεί για την αξιολόγηση των προγεννητικών και μεταγεννητικών επιδράσεων των χημικών ουσιών στην ανάπτυξη, καθώς και για την ενδελεχή αξιολόγηση της συστημικής τοξικότητας σε κυοφορούντα και θηλάζοντα θηλυκά ζώα και νεαρούς και ενήλικους απογόνους. Με τη λεπτομερή εξέταση βασικών τελικών σημείων της ανάπτυξης, όπως η βιωσιμότητα των απογόνων, η υγεία των νεογνών, η ανάπτυξη κατά τη γέννηση και η σωματική και λειτουργική ανάπτυξη έως την ενηλικίωση, αναμένεται ότι θα προσδιορίζονται συγκεκριμένα όργανα-στόχοι στους απογόνους. Επιπλέον, η μελέτη θα παρέχει και/ή θα επιβεβαιώνει πληροφορίες για τις επιδράσεις της εκάστοτε ελεγχόμενης χημικής ουσίας στην αρτιότητα και στις επιδόσεις του αναπαραγωγικού συστήματος των ενήλικων αρσενικών και θηλυκών ζώων. Ειδικότερα, λαμβάνονται υπόψη, μεταξύ άλλων, οι ακόλουθες παράμετροι: λειτουργία των γονάδων, οιστρικός κύκλος, ωρίμαση του σπέρματος στις επιδιδυμίδες, συσκευτική συμπεριφορά, σύλληψη, κύηση, τοκετός και γαλουχία. Επιπροσθέτως, χάρη στις πληροφορίες που προέρχονται από τις αξιολογήσεις αναπτυξιακής νευροτοξικότητας και ανοσοτοξικότητας θα χαρακτηρίζονται οι ενδεχόμενες επιδράσεις στα συστήματα αυτά. Τα δεδομένα που προκύπτουν από τις εν λόγω δοκιμές αυτές αναμένεται ότι θα επιτρέπουν τον προσδιορισμό των επιπέδων στα οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (NOAEL), των κατώτατων επιπέδων στα οποία παρατηρούνται δυσμενείς επιδράσεις (LOAEL) και/ή δόσεων αναφοράς για τα διάφορα τελικά σημεία και/ή θα χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό επιδράσεων που έχουν ανιχνευθεί σε προγενέστερες μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση και/ή θα χρησιμεύουν ως οδηγός για επόμενες δοκιμές.
6. Στο σχήμα 1 παρατίθεται σχεδιάγραμμα του πρωτοκόλλου. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνεχώς σε κλιμακωτές δόσεις σε διάφορες ομάδες σεξουαλικά ώριμων αρσενικών και θηλυκών ζώων. Χορηγούνται δόσεις στη γονική γενεά (P) κατά τη διάρκεια καθορισμένης περιόδου πριν από το ζευγάρισμα (που επιλέγεται βάσει των διαθέσιμων πληροφοριών για την ελεγχόμενη χημική ουσία, αλλά έχει ελάχιστη διάρκεια δύο εβδομάδων) και κατά την περίοδο ζευγαρώματος, που διαρκεί δύο εβδομάδες. Τα αρσενικά ζώα P υποβάλλονται περαιτέρω σε αγωγή τουλάχιστον έως τον απογαλακτισμό της γενεάς F_1 . Η αγωγή αυτή θα πρέπει να έχει ελάχιστη διάρκεια 10 εβδομάδων και μπορεί να παρατείνεται, εάν χρειάζεται να διασαφηνιστούν επιδράσεις στην αναπαραγωγή. Η αγωγή των θηλυκών ζώων P συνεχίζεται κατά την κύηση και τη γαλουχία έως τη λήξη της μελέτης, μετά τον απογαλακτισμό των νεογνών τους (ήτοι, 8-10 εβδομάδες αγωγής). Οι απόγονοι F_1 υποβάλλονται σε περαιτέρω αγωγή με την ελεγχόμενη χημική ουσία από τον απογαλακτισμό έως την ενηλικίωσή τους. Εάν αξιολογείται δεύτερη γενεά [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 117 του ΟΟΣΑ (39)], η αγωγή των απογόνων F_1 συνεχίζει έως τον απογαλακτισμό της γενεάς F_2 ή τη λήξη της μελέτης.
7. Όλα τα ζώα υποβάλλονται σε κλινικές παρατηρήσεις και παθολογικές εξετάσεις για σημεία τοξικότητας, με ιδιαίτερη έμφαση στην αρτιότητα και τις επιδόσεις των αρσενικών και θηλυκών αναπαραγωγικών συστημάτων, καθώς και στην υγεία, την αύξηση, την ανάπτυξη και τις λειτουργίες των απογόνων. Κατά τον απογαλακτισμό, επιλεγμένοι απόγονοι κατανέμονται σε συγκεκριμένες υποομάδες (κοόρτες 1-3, βλ. παραγράφους 33 και 34 και σχήμα 1) για περαιτέρω διερεύνηση, η οποία καλύπτει, μεταξύ άλλων, τη σεξουαλική ωρίμαση, την αρτιότητα και τη λειτουργία των αναπαραγωγικών οργάνων, νευρολογικά και συμπεριφορικά τελικά σημεία και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.
8. Κατά τη διεξαγωγή της μελέτης θα πρέπει να εφαρμόζονται οι γενικές αρχές και τα κριτήρια που περιγράφονται στο καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 19 του ΟΟΣΑ σχετικά με την αναγνώριση, την αξιολόγηση και τη χρήση κλινικών σημείων ως ανώδυνων τελικών σημείων για τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται σε αξιολογήσεις ασφάλειας (34).

9. Όταν θα είναι διαθέσιμος επαρκής αριθμός μελετών για να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος αυτού του νέου σχεδιασμού της μελέτης, η μέθοδος δοκιμών θα επανεξεταστεί και, εάν κριθεί απαραίτητο, θα αναθεωρηθεί βάσει της πείρας που θα έχει αποκομιστεί.

Σχήμα 1

Σχεδιάγραμμα της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς



@ ένα ανά γέννα και αντιπροσωπευτικό 20 γεννών συνολικά, ει δυνατόν

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ/ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΗ

Ζώα

Επιλογή είδους και στελέχους ζώων

10. Η επιλογή ζωικού είδους για τη δοκιμή τοξικότητας στην αναπαραγωγή θα πρέπει να μελετάται με προσοχή βάσει όλων των διαθέσιμων πληροφοριών. Ωστόσο, λόγω του όγκου των δεδομένων τεκμηρίωσης και της συγκρισιμότητας με τις δοκιμές γενικής τοξικότητας, προτιμώμενο είδος είναι συνήθως ο επίμυς, τον οποίο και αφορούν τα κριτήρια και οι συστάσεις της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Σε περίπτωση χρήσης άλλου είδους, θα πρέπει να αναφέρονται οι σχετικοί λόγοι και απαιτούνται κατάλληλες τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου. Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται στελέχη με χαμηλή γονιμότητα ή γνωστή υψηλή συχνότητα εμφάνισης (επίπτωση) αυτόματων αναπτυξιακών διαμαρτιών.

Κριτήρια σχετικά με την ηλικία, το σωματικό βάρος και την ένταξη στη μελέτη

11. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται υγιή γονικά ζώα, τα οποία δεν έχουν υποβληθεί σε πειραματικές διαδικασίες στο παρελθόν. Θα πρέπει να μελετώνται και τα δύο φύλα και τα θηλυκά ζώα να είναι άτοκα και να μη βρίσκονται σε κατάσταση εγκυμοσύνης. Τα ζώα P πρέπει να είναι σεξουαλικά ώριμα, να έχουν παρόμοιο βάρος (ανάλογα με το φύλο) κατά την έναρξη της χορήγησης δόσεων, παρόμοια ηλικία (περίπου 90 ημερών) κατά το ζευγάρωμα και να είναι αντιπροσωπευτικά του είδους και του στελέχους που μελετάται. Μετά την άφιξή τους, τα ζώα θα πρέπει να εγκλιματίζονται για 5 τουλάχιστον ημέρες. Κατανέμονται τυχαία στις ομάδες μαρτύρων και αγωγής, κατά τρόπο ώστε οι μέσες τιμές σωματικού βάρους να είναι συγκρίσιμες μεταξύ των ομάδων (ήτοι $\pm 20\%$ της μέσης τιμής).

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

12. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζωων θα πρέπει να είναι $22\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^\circ\text{C}$). Η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι $30\text{-}70\%$, με ιδανικό εύρος τιμών $50\text{-}60\%$. Ο τεχνητός φωτισμός ρυθμίζεται σε φωτοπερίοδο 12 ωρών. Μπορούν να χρησιμοποιούνται συμβατικά εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην περιεκτικότητα του σιτηρεσίου σε φυτοοιστρογόνα, διότι τα υψηλά επίπεδα φυτοοιστρογόνων στην

τροφή είναι πιθανόν να επηρεάσουν ορισμένα τελικά σημεία της αναπαραγωγής. Συνιστάται η χρήση τυποποιημένων σιτηρεσιών ελεύθερης σύνθεσης, η περιεκτικότητα των οποίων σε χημικά οιστρογόνα έχει μειωθεί (2) (30). Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω της τροφής, η επιλογή σιτηρεσίου ενδέχεται να επηρεάζεται από την ανάγκη κατάλληλης πρόσμεξης της ουσίας. Θα πρέπει να εξακριβώνονται η περιεκτικότητα, η ομοιογένεια και η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο. Η τροφή και το πόσιμο νερό θα πρέπει να υποβάλλονται σε τακτική ανάλυση για προσμείξεις. Δείγματα κάθε παρτίδας του σιτηρεσίου που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να φυλάσσονται σε κατάλληλες συνθήκες (π.χ. κατεψυγμένα στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) έως την οριστικοποίηση της έκθεσης, για το ενδεχόμενο να απαιτηθεί περαιτέρω ανάλυση των συστατικών του σιτηρεσίου λόγω των αποτελεσμάτων.

13. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε κλωβούς σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου και της ίδιας αγωγής. Επιτρέπεται να στεγάζονται ατομικά προκειμένου να αποφευχθούν πιθανοί τραυματισμοί (π.χ. των αρσενικών ζώων μετά την περίοδο ζευγαρώματος). Οι διαδικασίες ζευγαρώματος θα πρέπει να εκτελούνται σε κατάλληλους κλωβούς. Αφού υπάρξουν ενδείξεις συνουσίας, τα θηλυκά ζώα που θεωρείται ότι κυοφορούν στεγάζονται χωριστά σε κλωβούς τοκετού, όπου τους παρέχονται κατάλληλα και καθορισμένα υλικά κατασκευής φωλιάς. Τα νεογνά στεγάζονται με τις μητέρες τους έως τον απογαλακτισμό. Τα ζώα της γενεάς F_1 θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες του ίδιου φύλου και της ίδιας αγωγής από τον απογαλακτισμό έως τη λήξη της μελέτης. Εάν δικαιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά. Τα επίπεδα φυτοοιστρογόνων στο επιλεγμένο υλικό στρωμνής θα πρέπει να είναι ελάχιστα.

Αριθμός και ταυτοποίηση των ζώων

14. Κατά κανόνα, κάθε ομάδα αγωγής και μαρτύρων θα πρέπει να περιέχει επαρκή αριθμό αναπαραγωγικών ζευγών ώστε να προκύπτουν τουλάχιστον 20 κυοφορούντα θηλυκά ζώα ανά ομάδα δόσης. Στόχος είναι να προκαλούνται επαρκείς κυοφορίες για να εξασφαλίζεται η ουσιαστική αξιολόγηση της ικανότητας της χημικής ουσίας να επιδρά στη γονιμότητα, στην κύηση και στη μητρική συμπεριφορά των ζώων της γενεάς P, καθώς και στην αύξηση και την ανάπτυξη των απογόνων F_1 από τη σύλληψη ως την ενηλικίωση. Η αδυναμία επίτευξης του επιθυμητού αριθμού κυοφορούντων ζώων δεν ακυρώνει, κατ' ανάγκη, τη μελέτη και θα πρέπει να αξιολογείται κατά περίπτωση, λαμβανομένης υπόψη της πιθανής αιτιώδους σχέσης με την ελεγχόμενη χημική ουσία.
15. Κάθε ζώο P λαμβάνει αποκλειστικό αναγνωριστικό αριθμό πριν από την έναρξη της χορήγησης των δόσεων. Εάν τα ιστορικά δεδομένα του εργαστηρίου δείχνουν ότι ένα σημαντικό ποσοστό των θηλυκών ζώων ενδέχεται να μην έχουν τακτικό οιστρικό κύκλο (4 ή 5 ημερών), συνιστάται εκτίμηση του οιστρικού κύκλου πριν από την έναρξη της αγωγής. Εναλλακτική λύση είναι η αύξηση του μεγέθους της ομάδας, ώστε να εξασφαλίζεται ότι τουλάχιστον 20 θηλυκά ζώα σε κάθε ομάδα θα έχουν τακτικό οιστρικό κύκλο (4 ή 5 ημερών) κατά την έναρξη της αγωγής. Όλοι οι απόγονοι F_1 λαμβάνουν μοναδικό αναγνωριστικό αριθμό κατά την πρώτη εξέταση των νεογνών τη μεταγεννητική ημέρα (ΜΓΗ) 0 ή 1. Καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης θα πρέπει να τηρούνται αρχεία που να αναφέρουν τις γέννες από τις οποίες προέρχονται όλα τα ζώα F_1 και, κατά περίπτωση, τα ζώα F_2 .

Ελεγχόμενη χημική ουσία

Διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία

16. Η ανασκόπηση των υφιστάμενων πληροφοριών είναι σημαντική για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με την οδό χορήγησης, την επιλογή φορέα, ζωικού είδους και δοσολογίας και με τις ενδεχόμενες τροποποιήσεις του δοσολογικού σχήματος. Συνεπώς, όταν προγραμματίζεται η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι σχετικές διαθέσιμες πληροφορίες για την ελεγχόμενη χημική ουσία, ήτοι φυσικοχημικές, τοξικοκινητικές (συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού στο συγκεκριμένο είδος) και τοξικοδυναμικές ιδιότητες, σχέσεις δομής-δράσης, μεταβολικές διαδικασίες *in vitro*, αποτελέσματα προγενέστερων μελετών τοξικότητας και αντίστοιχες πληροφορίες για ουσίες ανάλογης δομής. Προκαταρκτικές πληροφορίες για την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση (ADME), καθώς και για τη βιοσυσώρευση, είναι δυνατόν να προκύψουν από τη χημική δομή, τα φυσικοχημικά δεδομένα και από μελέτες με αντικείμενο τον βαθμό σύνδεσης με πρωτεΐνες του πλάσματος ή την τοξικοκινητική, ενώ τα αποτελέσματα μελετών τοξικότητας παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες, π.χ. για το επίπεδο NOAEL, τον μεταβολισμό ή την επαγωγή μεταβολισμού.

Εξέταση τοξικοκινητικών δεδομένων

17. Τα τοξικοκινητικά δεδομένα από μελέτες καθορισμού εύρους δόσεων ή άλλες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν, παρόλο που δεν απαιτούνται, είναι εξαιρετικά χρήσιμα για τον σχεδιασμό της μελέτης, την επιλογή των επιπέδων δόσης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ιδιαίτερος χρήσιμα είναι τα δεδομένα που 1) επαληθεύουν την έκθεση των αναπτυσσόμενων εμβρύων και νεογνών στην ελεγχόμενη χημική ουσία (ή στους αντίστοιχους μεταβολίτες), 2) παρέχουν εκτιμήσεις εσωτερικής δοσιμετρίας και 3) αξιολογούν τον δυναμικό δοσοεξαρτώμενο κορεσμό των διαδικασιών κινητικής.

Θα πρέπει να εξετάζονται επίσης, εφόσον είναι διαθέσιμα, και επιπλέον τοξικοκινητικά δεδομένα, όπως η τυπολογία των μεταβολιών, η πορεία της συγκέντρωσης συναρτήσει του χρόνου κ.λπ. Συμπληρωματικά τοξικοκινητικά δεδομένα είναι επίσης δυνατόν να συγκεντρωθούν κατά τη διάρκεια της κυρίως μελέτης, υπό τον όρο ότι δεν παρεμποδίζεται η συλλογή και ερμηνεία των τελικών σημείων της.

Γενικά, το ακόλουθο σύνολο τοξικοκινητικών δεδομένων είναι χρήσιμο για τον προγραμματισμό της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς:

- προχωρημένη κύηση (π.χ. 20ή ημέρα κύησης) — αίμα από τη μητέρα και το έμβρυο·
- μέσα της γαλουχίας (10η ΜΓΗ) — αίμα από τη μητέρα και το νεογνό και/ή γάλα·
- αρχές του απογαλακτισμού (π.χ. 28η ΜΓΗ) — δείγματα αίματος από τα απογαλακτισμένα ζώα.

Απαιτείται ευελιξία κατά τον προσδιορισμό των ειδικών αναλυτών (π.χ. μητρική χημική ουσία και/ή μεταβολίτες) και του σχήματος δειγματοληψίας. Παραδείγματος χάριν, ο αριθμός των δειγμάτων και η ώρα συλλογής τους σε μια δεδομένη ημέρα δειγματοληψίας εξαρτώνται από την οδό έκθεσης και τις υφιστάμενες γνώσεις σχετικά με τις τοξικοκινητικές ιδιότητες σε μη κυοφορούντα ζώα. Στην περίπτωση των διατροφικών μελετών, αρκεί η λήψη δειγμάτων μια σταθερή ώρα κάθε ημέρας δειγματοληψίας, ενώ η χορήγηση δόσεων με στομαχικό καθετήρα ενδέχεται να καθιστά αναγκαία την προσθήκη και άλλων χρόνων δειγματοληψίας προκειμένου να επιτευχθεί καλύτερη εκτίμηση του εύρους των εσωτερικών δόσεων. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητο να προκύπτει πλήρης πορεία της συγκέντρωσης συναρτήσει του χρόνου όλες τις ημέρες δειγματοληψίας. Εάν είναι απαραίτητο, τα δείγματα αίματος μπορούν να συνενώνονται ανά φύλο στο εσωτερικό της ίδιας γέννας για τις αναλύσεις στα έμβρυα και τα νεογνά.

Οδός χορήγησης

18. Για την επιλογή της οδού χορήγησης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι οδοί με τη μεγαλύτερη συνάφεια προς την έκθεση του ανθρώπου. Παρόλο που το πρωτόκολλο έχει σχεδιαστεί για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω της τροφής, μπορεί να τροποποιηθεί για χορήγηση μέσω άλλων οδών (πόσιμο νερό, στομαχικός καθετήρας, εισπνοή, δέρμα) ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της χημικής ουσίας και τις απαιτούμενες πληροφορίες.

Επιλογή του φορέα

19. Εφόσον είναι αναγκαίο, παρασκευάζεται διάλυμα ή εναιώρημα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε κατάλληλο φορέα. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα, στο μέτρο του δυνατού, η χρήση υδατικών διαλυμάτων/εναιωρημάτων, με δεύτερα κατά σειρά προτίμησης τα διαλύματα/εναιωρήματα σε έλαιο (π.χ. αραβοσιτέλαιο). Σε περίπτωση που ο φορέας δεν είναι το νερό, θα πρέπει να είναι γνωστά τα τοξικά χαρακτηριστικά του. Θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση φορέων με δυνητική εγγενή τοξικότητα (π.χ. ακετόνη, DMSO) και να προσδιορίζεται η σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον φορέα. Εάν χρησιμοποιείται φορέας ή άλλο πρόσθετο για τη διευκόλυνση της χορήγησης των δόσεων, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: επιδράσεις στην απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό ή την κατακράτηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, επιδράσεις στις χημικές της ιδιότητες που είναι δυνατόν να μεταβάλλουν τα τοξικά χαρακτηριστικά της και επιδράσεις στην κατανάλωση τροφής ή νερού ή στη διατροφική κατάσταση των ζώων.

Επιλογή δόσεων

20. Η μελέτη θα πρέπει κανονικά να περιλαμβάνει τρία τουλάχιστον επίπεδα δόσεων και έναν συντρέχοντα μάρτυρα. Κατά την επιλογή κατάλληλων επιπέδων δόσης, ο ερευνητής θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες, μεταξύ άλλων, πληροφορίες για τη χορήγηση δόσεων από προγενέστερες μελέτες, τοξικοκινητικά δεδομένα για κυοφορούντα ή μη ζώα, τον βαθμό μεταφοράς μέσω του θηλασμού και εκτιμήσεις της έκθεσης του ανθρώπου. Εάν υπάρχουν τοξικοκινητικά δεδομένα που καταδεικνύουν δόσοεξαρτώμενο κορεσμό των τοξικοκινητικών διαδικασιών, θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για την αποφυγή των υψηλών επιπέδων δόσης που εμφανίζουν σαφώς κορεσμό, υπό τον όρο, βεβαίως, ότι η έκθεση του ανθρώπου αναμένεται να είναι αρκετά μικρότερη από το σημείο κορεσμού. Στις περιπτώσεις αυτές, το ανώτατο επίπεδο δόσης θα πρέπει να είναι το σημείο καμψής για μετάβαση σε μη γραμμική τοξικοκινητική συμπεριφορά ή ελάχιστα υψηλότερο.
21. Εάν δεν υπάρχουν σχετικά τοξικοκινητικά δεδομένα, τα επίπεδα δόσης θα πρέπει να βασίζονται στις τοξικές επιδράσεις, εκτός εάν τα περιορίζουν οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν τα επίπεδα δόσης βασίζονται στην τοξικότητα, η μέγιστη δόση θα πρέπει να επιλέγεται με στόχο να επαχθεί ως έναν βαθμό συστηματική τοξικότητα, χωρίς όμως να προκληθεί θάνατος ή μεγάλη ταλαιπωρία στα ζώα.
22. Θα πρέπει να επιλέγεται φθίνουσα σειρά επιπέδων δόσης, ώστε να καταδεικνύονται οι σχετιζόμενες με τη δόση επιδράσεις και να καθορίζονται τιμές NOAEL ή δόσεις κοντά στο όριο ανίχνευσης, που καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό δόσεων αναφοράς για τα πλέον ευαίσθητα τελικά σημεία. Συχνά, η βέλτιστη επιλογή για να μην απέχουν πολύ οι δόσεις μεταξύ των επιπέδων NOAEL και LOAEL είναι η χρησιμοποίηση υποδιπλασίων ή υποτετραπλάσιων διαστημάτων. Η προσθήκη μιας τέταρτης ομάδας δοκιμής είναι πολλές φορές προτιμότερη από τη χρησιμοποίηση πολύ μεγάλων διαστημάτων μεταξύ των δόσεων (π.χ. με λόγο ακολουθίας άνω του 10).

23. Εκτός από τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τα ζώα της ομάδας μαρτύρων υφίστανται την ίδια ακριβώς μεταχείριση όπως τα υποκείμενα των ομάδων δοκιμής. Η ομάδα αυτή θα πρέπει να μην υποβάλλεται σε αγωγή ή να υποβάλλεται σε εικονική αγωγή ή, όταν χρησιμοποιείται φορέας για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, να είναι ομάδα μαρτύρων με τον φορέα. Εάν χρησιμοποιείται φορέας, πρέπει να χορηγείται στην ομάδα μαρτύρων στον μέγιστο χρησιμοποιούμενο όγκο.

Οριακή δοκιμή

24. Εάν δεν έχει διαπιστωθεί τοξικότητα με δόση τουλάχιστον 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα σε μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση ή εάν δεν αναμένεται να προκληθεί τοξικότητα, με βάση δεδομένα που αφορούν χημικές ουσίες αντίστοιχης δομής και/ή μεταβολισμού και υποδηλώνουν παρόμοιες μεταβολικές ιδιότητες in vivo/in vitro, ενδέχεται να μη είναι απαραίτητη μια μελέτη με χρήση πολλών επιπέδων δόσεων. Στις περιπτώσεις αυτές, η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς θα μπορούσε να διεξαχθεί με τη χρήση μίας ομάδας μαρτύρων και μίας μόνο δόσης τουλάχιστον 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Ωστόσο, εάν διαπιστωθεί αναπαραγωγική ή αναπτυξιακή τοξικότητα με αυτή την οριακή δόση, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με χαμηλότερα επίπεδα δόσης για τον προσδιορισμό του NOAEL. Οι σχετικές με την οριακή δοκιμή εκτιμήσεις ισχύουν μόνο εφόσον η ανθρώπινη έκθεση δεν καθιστά αναγκαία τη χρήση υψηλότερου επιπέδου δόσης.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

Έκθεση των απογόνων

25. Η έκθεση μέσω της τροφής είναι η προτιμώμενη μέθοδος χορήγησης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στις μελέτες με χρήση στομαχικού καθετήρα, τα νεογνά λαμβάνουν κατά κανόνα την ελεγχόμενη χημική ουσία μόνον έμμεσα μέσω του γάλακτος, μέχρις ότου αρχίσει η απευθείας χορήγηση δόσεων σε αυτά μετά τον απογαλακτισμό. Στις μελέτες έκθεσης μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, τα νεογνά λαμβάνουν επιπροσθέτως την ελεγχόμενη χημική ουσία άμεσα, όταν αρχίζουν να τρώνε μόνα τους κατά τη διάρκεια της τελευταίας εβδομάδας της περιόδου γαλουχίας. Όταν η απέκκριση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο γάλα είναι περιορισμένη και όταν υπάρχει έλλειψη στοιχείων σχετικά με τη συνεχή έκθεση των απογόνων, θα πρέπει να μελετάται η τροποποίηση του σχεδιασμού της μελέτης. Στις περιπτώσεις αυτές, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο απευθείας χορήγησης δόσεων στα νεογνά κατά την περίοδο της γαλουχίας βάσει των διαθέσιμων τοξικοκινητικών πληροφοριών, της τοξικότητας στους απογόνους ή αλλαγών στους βιοδείκτες (3) (4). Πρέπει να μελετώνται προσεκτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής με απευθείας χορήγηση δόσεων σε νεογνά που θηλάζουν (5).

Δοσολογικό σχήμα και χορήγηση των δόσεων

26. Ενδέχεται να υπάρχουν ορισμένες πληροφορίες για τον οιστρικό κύκλο, την ιστοπαθολογία του αρσενικού και του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος και την ανάλυση του σπέρματος στους όρχεις/στις επιδιδυμίδες από προγενέστερες, κατάλληλης διάρκειας, μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση. Ως εκ τούτου, η διάρκεια της αγωγής πριν από το ζευγάρωμα στη εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς στοχεύει στην ανίχνευση των επιδράσεων σε λειτουργικές αλλαγές, που ενδέχεται να παρεμποδίζουν τη συζευκτική συμπεριφορά και τη γονιμοποίηση. Η αγωγή πριν από το ζευγάρωμα πρέπει να έχει αρκετά μεγάλη διάρκεια ώστε να επιτυγχάνονται σταθερές συνθήκες έκθεσης των αρσενικών και θηλυκών ζώων P. Στις περισσότερες περιπτώσεις, θεωρείται επαρκής μια αγωγή διάρκειας 2 εβδομάδων πριν από το ζευγάρωμα και στα δύο φύλα. Στα θηλυκά ζώα, η διάρκεια αυτή καλύπτει 3-4 πλήρεις οιστρικούς κύκλους και κανονικά επαρκεί για την ανίχνευση δυσμενών επιδράσεων στην κυκλικότητα. Στα αρσενικά ζώα, ισοδυναμεί με τον χρόνο που απαιτείται για τη διέλευση των σπερματοζωαρίων που ωριμάζουν από τις επιδιδυμίδες και κανονικά επιτρέπει την ανίχνευση επιδράσεων στο σπέρμα μετά την έξοδό του από τους όρχεις (κατά τα τελικά στάδια της σπερμίας και της ωρίμασης του σπέρματος στις επιδιδυμίδες) κατά το ζευγάρωμα. Κατά τη λήξη της μελέτης, όταν έχουν προγραμματιστεί ιστοπαθολογικές εξετάσεις των όρχεων και των επιδιδυμίδων και ανάλυση των παραμέτρων του σπέρματος, τα αρσενικά ζώα P και F₁ θα έχουν εκτεθεί τουλάχιστον για μία ολόκληρη διαδικασία σπερματογένεσης [(6) (7) (8) (9) και καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)].
27. Τα σενάρια έκθεσης των αρσενικών ζώων πριν από το ζευγάρωμα μπορούν να προσαρμοστούν, εάν έχουν διαπιστωθεί σαφώς σε προγενέστερες μελέτες τοξικότητα στους όρχεις (μείωση της σπερματογένεσης) ή επιδράσεις στην αρτιότητα και τη λειτουργία του σπέρματος. Αντιστοίχως, στα θηλυκά ζώα, οι γνωστές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον οιστρικό κύκλο και, κατ' επέκταση, στη σεξουαλική δεκτικότητα μπορεί να δικαιολογούν διαφορετικά σενάρια έκθεσης πριν από το ζευγάρωμα. Σε ειδικές περιπτώσεις, ενδέχεται να είναι αποδεκτή η έναρξη της αγωγής των θηλυκών ζώων P μόνο αφού ληφθεί πρώτα θετικό για σπέρμα επίχρισμα [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)].
28. Μετά τον καθορισμό της περιόδου χορήγησης δόσεων πριν από το ζευγάρωμα, τα ζώα θα πρέπει να λαμβάνουν συνεχώς την ελεγχόμενη χημική ουσία, 7 ημέρες την εβδομάδα, έως τη νεκροψία. Οι δόσεις θα πρέπει να χορηγούνται σε όλα τα ζώα με την ίδια μέθοδο. Η χορήγηση των δόσεων θα πρέπει να συνεχίζεται κατά τη διάρκεια της περιόδου ζευγαρώματος που διαρκεί 2 εβδομάδες και, στα θηλυκά ζώα P, καθ' όλη τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας έως την ημέρα θανάτωσης μετά τον απογαλακτισμό. Η αγωγή θα πρέπει να χορηγείται στα αρσενικά ζώα με τον ίδιο τρόπο έως τη θανάτωση κατά τον χρόνο απογαλακτισμού των ζώων F₁. Όσον αφορά τη νεκροψία, θα πρέπει να δίδεται προτεραιότητα στα θηλυκά ζώα, που πρέπει να νεκροτομούνται την ίδια ή παραπλήσια ημέρα γαλουχίας. Η νεκροψία των αρσενικών ζώων

μπορεί να εκτείνεται σε περισσότερες ημέρες, ανάλογα με τις εργαστηριακές εγκαταστάσεις. Η απευθείας χορήγηση δόσεων στα επιλεγμένα αρσενικά και θηλυκά ζώα F_1 , εάν δεν έχει αρχίσει κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, θα πρέπει να αρχίζει κατά τον απογαλακτισμό και να συνεχίζεται έως την προγραμματισμένη νεκροψία, ανάλογα με την ένταξη στις ομάδες μελέτης.

29. Στην περίπτωση των χημικών ουσιών που χορηγούνται μέσω της τροφής ή του πόσιμου νερού, έχει σημασία να εξασφαλίζεται ότι οι χορηγούμενες ποσότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας δεν επηρεάζουν το φυσιολογικό ισοζύγιο τροφής ή νερού. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω της τροφής, μπορεί να χρησιμοποιείται είτε μια σταθερή συγκέντρωση στο σιτηρέσιο (ppm) είτε ένα σταθερό επίπεδο δόσης ως προς το σωματικό βάρος του ζώου. Η επιλογή μεταξύ των δύο εναλλακτικών δυνατοτήτων θα πρέπει να προσδιορίζεται.
30. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με στομαχικό καθετήρα, ο όγκος υγρού που χορηγείται κάθε φορά θα πρέπει κανονικά να μην υπερβαίνει το 1 ml/100 g σωματικού βάρους (το ανώτατο όριο είναι 0,4 ml/100 g σωματικού βάρους σε περίπτωση χρήσης ελαίου, π.χ. αραβοσιτελαίου). Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές χημικές ουσίες, των οποίων οι επιδράσεις κανονικά επιδεινώνονται από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, η μεταβλητότητα του όγκου δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης. Η αγωγή θα πρέπει να χορηγείται την ίδια περίπου ώρα κάθε ημέρα. Η χορηγούμενη σε κάθε ζώο δόση θα πρέπει κανονικά να βασίζεται στον πλέον πρόσφατο προσδιορισμό του σωματικού βάρους του και να ρυθμίζεται τουλάχιστον εβδομαδιαίως στα ενήλικα αρσενικά και τα ενήλικα μη κυοφορούντα θηλυκά ζώα και ανά δύο ημέρες στα κυοφορούντα θηλυκά ζώα και στα ζώα F_1 , όταν χορηγείται πριν από τον απογαλακτισμό και κατά τις 2 εβδομάδες που έπονται του απογαλακτισμού. Εάν τα τοξικοκινητικά δεδομένα δείχνουν χαμηλή μεταφορά της ελεγχόμενης χημικής ουσίας μέσω του πλακούντα, η δόση που χορηγείται με στομαχικό καθετήρα κατά την τελευταία εβδομάδα της κύησης ενδέχεται να πρέπει να ρυθμιστεί ώστε να προληφθεί η χορήγηση υπερβολικά τοξικής δόσης στη μητέρα. Τα θηλυκά ζώα δεν θα πρέπει να υποβάλλονται στην αγωγή με στομαχικό καθετήρα ή από οποιαδήποτε άλλη οδό απαιτεί χειρισμό των ζώων κατά την ημέρα του τοκετού. Είναι προτιμότερο να παραλείπεται η χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας τη συγκεκριμένη ημέρα παρά να διαταράσσεται η διαδικασία της γέννησης.

Ζευγάρωμα

31. Κάθε θηλυκό ζώο P θα πρέπει να τοποθετείται μαζί με ένα μόνο, τυχαία επιλεγμένο και μη συγγενικό αρσενικό από την ίδια ομάδα δόσης (ζεύγη 1:1) μέχρις να παρατηρηθούν ενδείξεις συνουσίας ή να παρέλθουν 2 εβδομάδες. Εάν δεν υπάρχει επαρκής αριθμός αρσενικών ζώων, παραδείγματος χάριν λόγω θανάτου πριν από τον σχηματισμό των αναπαραγωγικών ζευγών, αρσενικά ζώα που έχουν ήδη συζευχθεί επιτρέπεται να συζευχθούν (1:1) με δεύτερο θηλυκό ώστε να συζευχθούν όλα τα θηλυκά ζώα. Ως ημέρα 0 της κύησης ορίζεται η ημέρα κατά την οποία επιβεβαιώνονται οι ενδείξεις ζευγαρώματος (ανιχνεύεται κολπικό βύσμα ή σπέρμα). Τα ζώα θα πρέπει να αποχωρίζονται το συντομότερο δυνατό μετά την παρατήρηση ενδείξεων συνουσίας. Ελλείψει ζευγαρώματος μετά από 2 εβδομάδες, τα ζώα θα πρέπει να αποχωρίζονται χωρίς να τους δίνεται άλλη ευκαιρία ζευγαρώματος. Στα δεδομένα θα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς τα αναπαραγωγικά ζεύγη.

Μέγεθος γέννας

32. Κατά την τέταρτη ημέρα μετά τη γέννηση, το μέγεθος κάθε γέννας μπορεί να διορθωθεί με την απομάκρυνση πλεοναζόντων νεογνών με τυχαία επιλογή, ώστε να προκύψουν αριθμοί ζώων ανά φύλο όσο το δυνατόν πλησιέστεροι στα πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά ζώα ανά γέννα. Δεν είναι ορθή η επιλεκτική απομάκρυνση νεογνών, π.χ. βάσει του σωματικού βάρους. Όταν ο αριθμός των αρσενικών ή θηλυκών νεογνών δεν επιτρέπει την επίτευξη πέντε ζώων ανά φύλο ανά γέννα, είναι αποδεκτή η μερική προσαρμογή (π.χ. έξι αρσενικά και τέσσερα θηλυκά).

Επιλογή νεογνών για μελέτες μετά τον απογαλακτισμό (βλ. σχήμα 1)

33. Μετά τον απογαλακτισμό (περίπου την 21η ΜΓΗ) επιλέγονται έως 20 νεογνά ανά ομάδα δόσης και μαρτύρων, από όλες τις γέννες, για περαιτέρω εξετάσεις και διατηρούνται έως τη σεξουαλική τους ωρίμαση (εκτός εάν απαιτείται να υποβληθούν σε εξετάσεις νωρίτερα). Τα νεογνά επιλέγονται τυχαία, χωρίς όμως να συμπεριλαμβάνονται εμφανώς καχεκτικά ζώα (ζώα με σωματικό βάρος μικρότερο του μέσου βάρους των νεογνών της οικείας γέννας κατά περισσότερο από δύο τυπικές αποκλίσεις), διότι πιθανότατα δεν είναι αντιπροσωπευτικά της ομάδας αγωγής.

Την 21η ΜΓΗ τα επιλεγμένα νεογνά F_1 κατανέμονται τυχαία σε μία από τις ακόλουθες τρεις κοόρτες ζώων:

Κοόρτη 1 (1A και 1B) = Δοκιμή αναπαραγωγικής/αναπτυξιακής τοξικότητας

Κοόρτη 2 (2A και 2B) = Δοκιμή αναπτυξιακής νευροτοξικότητας

Κοόρτη 3 = Δοκιμή αναπτυξιακής ανοσοτοξικότητας.

Κοόρτη 1A: ένα αρσενικό και ένα θηλυκό νεογνό/γέννα/ομάδα (20/φύλο/ομάδα) — επιλογή κατά προτεραιότητα για τη βασική αξιολόγηση των επιδράσεων στα αναπαραγωγικά συστήματα και της γενικής τοξικότητας.

Κοόρτη 1B: ένα αρσενικό και ένα θηλυκό νεογνό/γέννα/ομάδα (20/φύλο/ομάδα) — επιλογή κατά προτεραιότητα για συνέχεια στην αξιολόγηση των αναπαραγωγικών επιδόσεων με το ζευγάρι ζώων F_1 , όταν δίδεται συνέχεια [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 117 του ΟΟΣΑ (39)], και για τη συγκέντρωση συμπληρωματικών ιστοπαθολογικών δεδομένων, σε περίπτωση υπονοιών για τοξικές για το αναπαραγωγικό ή το ενδοκρινικό σύστημα ουσίες ή όταν τα αποτελέσματα της κοόρτης 1A είναι αμφίσημα.

Κοόρτη 2A: συνολικά 20 νεογνά ανά ομάδα (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ανά ομάδα, ένα αρσενικό ή ένα θηλυκό ανά γέννα), για νευροσυμπεριφορικές δοκιμασίες και, στη συνέχεια, ιστοπαθολογική αξιολόγηση ως ενήλικα ζώα.

Κοόρτη 2B: συνολικά 20 νεογνά ανά ομάδα (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ανά ομάδα, ένα αρσενικό ή ένα θηλυκό ανά γέννα), για νευρο-ιστοπαθολογική αξιολόγηση κατά τον απογαλακτισμό (την 21η ή 22η ΜΓΗ). Εάν δεν υπάρχει επαρκής αριθμός ζώων, θα πρέπει να δίνεται προτεραιότητα στην τοποθέτηση ζώων στην κοόρτη 2A.

Κοόρτη 3: συνολικά 20 νεογνά ανά ομάδα (10 αρσενικά και 10 θηλυκά ανά ομάδα, ένα ανά γέννα, εάν είναι δυνατόν). Ενδέχεται να απαιτούνται επιπλέον νεογνά από την ομάδα μαρτύρων για να χρησιμεύσουν ως θετικοί μάρτυρες στον προσδιορισμό εξαρτώμενης από κύτταρα T απόκρισης αντισωμάτων (TDAR) την (56 ± 3) η ΜΓΗ.

34. Εάν δεν υπάρχει επαρκής αριθμός νεογνών σε μια γέννα για να καλυφθούν όλες οι κοόρτες, προηγείται η κοόρτη 1, καθώς μπορεί να διευρυνθεί για την παραγωγή γενεάς F_2 . Είναι δυνατόν να τοποθετηθούν επιπλέον νεογνά σε οποιαδήποτε κοόρτη σε περίπτωση συγκεκριμένων ανησυχιών, π.χ. εάν υπάρχουν υπόνοιες ότι μια χημική ουσία είναι νευροτοξική, ανοσοτοξική ή τοξική για την αναπαραγωγή. Τα νεογνά αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξετάσεις σε διαφορετικούς χρόνους ή για την αξιολόγηση συμπληρωματικών τελικών σημείων. Τα νεογνά που δεν τοποθετούνται σε κοόρτη υποβάλλονται σε κλινικές βιοχημικές εξετάσεις (παράγραφος 55) και σε νεκροψία-νεκροτομή (παράγραφος 68).

Δεύτερο ζευγάρι των ζώων P

35. Κατά κανόνα, δεν συνιστάται δεύτερο ζευγάρι των ζώων P, επειδή συνεπάγεται απώλεια σημαντικών πληροφοριών για τον αριθμό των θέσεων εμφύτευσης όσον αφορά την πρώτη γέννα (και κατ' επέκταση, δεδομένων για απώλειες μετά την εμφύτευση και κατά την περιγεννητική περίοδο, τα οποία αποτελούν δείκτες πιθανού δυναμικού τερατογένεσης). Η ανάγκη επαλήθευσης ή διαλεύκανσης μιας επίδρασης σε θηλυκά ζώα που έχουν εκτεθεί εξυπηρετείται καλύτερα με τη διεύρυνση της μελέτης ώστε να περιλαμβάνει ζευγάρι ζώων της γενεάς F_1 . Ωστόσο, το δεύτερο ζευγάρι αρσενικών ζώων P με θηλυκά που δεν έχουν υποβληθεί σε αγωγή δεν παύει να αποτελεί επιλογή για τη διασαφήνιση αμφίσημων ευρημάτων ή για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των επιδράσεων στη γονιμότητα που παρατηρούνται κατά το πρώτο ζευγάρι.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ EN ΖΩΗ

Κλινικές παρατηρήσεις

36. Τα ζώα P και τα επιλεγμένα ζώα F_1 υποβάλλονται καθημερινά σε γενική κλινική παρατήρηση. Σε περίπτωση χορήγησης των δόσεων με στομαχικό καθετήρα, οι κλινικές παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται πριν και μετά τη χορήγηση της δόσης (για πιθανά σημεία τοξικότητας που συνδέονται με τη μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα). Καταγράφονται οι σχετικές αλλαγές στη συμπεριφορά, τα σημεία δύσκολου ή παρατεταμένου τοκετού και κάθε σημείο τοξικότητας. Δύο φορές ημερησίως (μία φορά ημερησίως το Σάββατοκύριακο), όλα τα ζώα παρατηρούνται για σοβαρή τοξικότητα, νοσηρότητα και θνησιμότητα.
37. Επιπλέον, όλα τα ζώα P και F_1 (μετά τον απογαλακτισμό) υποβάλλονται εβδομαδιαίως σε λεπτομερέστερη εξέταση, η οποία, για ευκολία, μπορεί να συνδυάζεται με τη ζύγιση του ζώου, ώστε να ελαχιστοποιείται το άγχος που προκαλούν στα ζώα οι χειρισμοί. Οι παρατηρήσεις θα πρέπει να διεξάγονται και να καταγράφονται επιμελώς, με τη χρήση συστημάτων βαθμολόγησης που έχουν καθοριστεί από το εκάστοτε εργαστήριο. Θα πρέπει να καταβάλλεται προσπάθεια ώστε να ελαχιστοποιούνται οι διακυμάνσεις των συνθηκών δοκιμής. Σημεία που θα πρέπει να καταγράφονται είναι, μεταξύ άλλων, αλλαγές στο δέρμα, το τρίχωμα, τους οφθαλμούς και τους βλεννογόνους, εκκρίσεις και απεκκρίσεις, καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος (π.χ. δακρύρροια, ανόρθωση τριχών, μεταβολή του μεγέθους της κόρης του οφθαλμού, ασυνήθης ρυθμός αναπνοής). Θα πρέπει να καταγράφονται επίσης οι αλλαγές στη βάρδια, τη στάση του σώματος και την αντίδραση στους χειρισμούς, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κρίσεων, στερεότυπων κινήσεων (όπως υπερβολική περιποίηση του τριχώματος, συνεχείς περιστροφές) ή περιέργης συμπεριφοράς (π.χ. αυτοακρωτηριασμός, οπισθοβάδιση).

Σωματικό βάρος και κατανάλωση τροφής/νερού

38. Τα ζώα P ζυγίζονται την πρώτη ημέρα χορήγησης δόσεων και, στη συνέχεια, τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση. Επιπλέον, τα θηλυκά ζώα P ζυγίζονται κατά τη γαλουχία την ίδια ημέρα με τα νεογνά τους (βλ. παράγραφο 44). Κάθε ζώο F₁ ζυγίζεται κατά τον απογαλακτισμό (21η ΜΓΗ) και, στη συνέχεια, τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση. Το σωματικό βάρος καταγράφεται επίσης την ημέρα που φτάνουν στην ήβη (ολοκλήρωση του διαχωρισμού της πόσθης ή του ανοίγματος του κόλπου). Όλα τα ζώα ζυγίζονται όταν θανατώνονται.
39. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, καταγράφεται η κατανάλωση τροφής και νερού (εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται μέσω του πόσιμου νερού), τουλάχιστον σε εβδομαδιαία βάση και την ίδια ημέρα με το σωματικό βάρος των ζώων (εκτός από την περίοδο της συμβίωσης). Η κατανάλωση τροφής σε κάθε κλωβό ζώων F₁ καταγράφεται σε εβδομαδιαία βάση, με αφετηρία την επιλογή του ζώου για κούρτη.

Οιστρικοί κύκλοι

40. Προκαταρκτικές πληροφορίες για τις σχετικές με την ελεγχόμενη χημική ουσία επιδράσεις στον οιστρικό κύκλο ενδέχεται να είναι ήδη διαθέσιμες από προηγούμενες μελέτες τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση και μπορούν να χρησιμοποιούνται στον σχεδιασμό του ειδικού για την ελεγχόμενη χημική ουσία πρωτοκόλλου της εκτεταμένης μελέτης τοξικότητας στην αναπαραγωγή μιας γενεάς. Κανονικά, η αξιολόγηση της κυκλικότητας του οίστρου (μέσω κολπικής κυτταρολογίας) ξεκινά στην αρχή της περιόδου αγωγής και συνεχίζεται έως ότου επιβεβαιωθεί το ζευγάρι ή λήξει η περίοδος ζευγαρώματος, που διαρκεί 2 εβδομάδες. Εάν έχει ελεγχθεί η κανονικότητα του οιστρικού κύκλου των θηλυκών ζώων πριν από την αγωγή, είναι χρήσιμο να συνεχίζεται η λήψη επιχρίσματος κατά την έναρξή της. Εάν όμως υπάρχουν ανησυχίες για μη εξειδικευμένες επιδράσεις κατά την έναρξη της αγωγής (όπως αρχική εμφανής μείωση της κατανάλωσης τροφής), μπορεί να δίδεται στα ζώα μέγιστος χρόνος δύο εβδομάδων για να προσαρμοστούν στην αγωγή, πριν από την έναρξη της περιόδου 2 εβδομάδων κατά την οποία λαμβάνεται επίχρισμα και η οποία καταλήγει στον σχηματισμό των ζευγών. Όταν η διάρκεια της αγωγής των θηλυκών ζώων παρατείνεται κατ' αυτόν τον τρόπο (δηλ. σε 4 εβδομάδες πριν από το ζευγάρισμα), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο προμήθειας ζώων μικρότερης ηλικίας και παράτασης της περιόδου αγωγής των αρσενικών ζώων πριν από τον σχηματισμό των ζευγών. Κατά τη λήψη κολπικών/τραχηλικών κυττάρων θα πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να αποφεύγεται η διατάραξη των βλενογόνων και η επακόλουθη επαγωγή ψευδοκύησης (10) (11).
41. Θα πρέπει να εξετάζονται καθημερινά κολπικά επιχρίσματα από όλα τα θηλυκά ζώα F₁ της κούρτης 1A, από την έναρξη του ανοίγματος του κόλπου έως ότου καταγραφεί το πρώτο κερατινοποιημένο επίχρισμα, για να προσδιορίζεται το χρονικό διάστημα μεταξύ των δύο αυτών συμβάντων. Θα πρέπει επίσης να παρακολουθούνται οι οιστρικοί κύκλοι όλων των θηλυκών ζώων F₁ της κούρτης 1A για δύο εβδομάδες, με αφετηρία την 75η ΜΓΗ περίπου. Επιπλέον, εάν είναι απαραίτητη το ζευγάρισμα ζώων της γενεάς F₁, παρακολουθείται η κολπική κυτταρολογία στην κούρτη 1B από τον σχηματισμό των ζευγών έως ότου διαπιστωθεί ζευγάρισμα.

Ζευγάρισμα και κύηση

42. Πέραν των τυπικών τελικών σημείων (π.χ. σωματικό βάρος, κατανάλωση τροφής, κλινικές παρατηρήσεις, συμπεριλαμβανομένων των ελέγχων θνησιμότητας/νοσηρότητας), καταγράφονται οι ημερομηνίες σχηματισμού των ζευγών, η ημερομηνία γονιμοποίησης και η ημερομηνία τοκετού και υπολογίζονται το χρονικό διάστημα πριν από τη συνουσία (από τον σχηματισμό των ζευγών έως τη γονιμοποίηση) και η διάρκεια της κύησης (από τη γονιμοποίηση έως τον τοκετό). Τα θηλυκά ζώα P θα πρέπει να εξετάζονται με προσοχή κατά τον χρόνο του αναμενόμενου τοκετού για σημεία δυστοκίας. Καταγράφεται κάθε ανωμαλία στη συμπεριφορά κατασκευής φωλιάς ή στις επιδόσεις θηλασμού.
43. Η ημερομηνία τοκετού είναι η ημέρα γαλουχίας 0 (ΗΓ 0) για τη μητέρα και η μεταγεννητική ημέρα 0 (ΜΓΗ 0) για τους απογόνους. Εναλλακτικά, όλες οι συγκρίσεις μπορούν επίσης να βασίζονται στον χρόνο μετά τη συνουσία, ώστε να εξαιρούνται τα σφάλματα στα δεδομένα μεταγεννητικής ανάπτυξης λόγω διαφορών στη διάρκεια της κύησης. Ωστόσο, θα πρέπει να καταγράφονται και οι μετρούμενοι χρόνοι σε σχέση με τον τοκετό. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία επηρεάζει τη διάρκεια της κύησης.

Παράμετροι σχετικά με τους απογόνους

44. Κάθε γέννα θα πρέπει να εξετάζεται το συντομότερο δυνατό μετά τον τοκετό (ΜΓΗ 0 ή 1) για να διαπιστωθούν ο αριθμός και το φύλο των νεογνών, των ζώων που γεννήθηκαν νεκρά και των ζώων που γεννήθηκαν ζωντανά, καθώς και η παρουσία μακροσκοπικών ανωμαλιών (εξωτερικά ορατές ανωμαλίες, μεταξύ των οποίων υπερωισχιστία, υποδόριες αιμορραγίες, μη φυσιολογικό χρώμα ή υφή της επιδερμίδας, παρουσία ομφάλιου λώρου, έλλειψη γάλακτος στον στόμαχο, παρουσία αποξηραμένων εκκρίσεων). Επιπλέον, η πρώτη κλινική εξέταση των νεογνών θα πρέπει να περιλαμβάνει ποιοτική εκτίμηση της θερμοκρασίας του σώματος, της δραστηριότητας και της αντίδρασης στους χειρισμούς. Τα νεογνά που βρίσκονται νεκρά την ΜΓΗ 0 ή αργότερα θα πρέπει να εξετάζονται για να διαπιστωθούν πιθανές διαμαρτίες και η αιτία θανάτου. Τα ζωντανά νεογνά καταμετρώνται και ζυγίζονται ατομικά τη ΜΓΗ 0 ή 1 και, στη συνέχεια, ανά τακτά διαστήματα, π.χ. τουλάχιστον την 4η, την 7η, τη 14η και την 21η ΜΓΗ. Οι κλινικές εξετάσεις, ανάλογα με την ηλικία των

ζών, θα πρέπει να επαναλαμβάνονται κατά τη ζύγιση των απογόνων ή συχνότερα, εάν έχουν προκύψει ειδικά ευρήματα κατά τη γέννηση. Μεταξύ των καταγραφόμενων σημείων συγκαταλέγονται, ενδεικτικά, οι εξωτερικές ανωμαλίες, οι αλλαγές στο δέρμα, το τρίχωμα, τα μάτια και τους βλεννογόνους, οι εκκρίσεις και απεκκρίσεις καθώς και δραστηριότητα του αυτόνομου νευρικού συστήματος. Θα πρέπει να καταγράφονται επίσης οι αλλαγές στη βάδιση, τη στάση του σώματος ή την αντίδραση στους χειρισμούς, καθώς και η εμφάνιση κλονικών ή τονικών κρίσεων, στερεότυπων κινήσεων ή περιέργης συμπεριφοράς.

45. Σε κάθε νεογνό θα πρέπει να μετράται η πρωκτογεννητική απόσταση, τουλάχιστον μία φορά μεταξύ της ΜΓΗ 0 και της 4ης ΜΓΗ. Θα πρέπει να προσδιορίζεται το σωματικό βάρος του νεογνού την ημέρα μέτρησης της πρωκτογεννητικής απόστασης, η οποία θα πρέπει να κανονικοποιείται σε ένα μέτρο του μεγέθους του νεογνού, κατά προτίμηση στην κυβική ρίζα του σωματικού βάρους (12). Τη 12η ή 13η ΜΓΗ θα πρέπει να ελέγχεται η παρουσία θηλών/άλων σε αρσενικά νεογνά.
46. Όλα τα επιλεγμένα ζώα F_1 εξετάζονται καθημερινά για να διαπιστωθεί ο διαχωρισμός της πόσθης στα αρσενικά και το άνοιγμα του κόλπου στα θηλυκά. Η εξέταση αυτή αρχίζει πριν από την αναμενόμενη ημέρα επίτευξης των συγκεκριμένων τελικών σημείων για να ανιχνεύεται η πρόωμη σεξουαλική ωρίμαση. Θα πρέπει να καταγράφεται κάθε ανωμαλία των γεννητικών οργάνων, όπως μόνιμη παρουσία κολπικού νηματίου (persistent vaginal thread), υποσπαδία ή σχιστία του πέους. Η σεξουαλική ωρίμαση των ζώων F_1 συγκρίνεται με τη σωματική ανάπτυξη με προσδιορισμό της ηλικίας και του σωματικού βάρους κατά τον διαχωρισμό της πόσθης στα αρσενικά ζώα και το άνοιγμα του κόλπου στα θηλυκά ζώα (13).

Αξιολόγηση της δυναμικής αναπτυξιακής νευροτοξικότητας (κοόρτες 2A και 2B)

47. Για τις αξιολογήσεις νευροτοξικότητας θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 2A και 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 2B από κάθε ομάδα αγωγής (για κάθε κοόρτη: τυχαία επιλογή 1 αρσενικού ή 1 θηλυκού ζώου ανά γέννα και εκπροσώπηση όλων των γεννών από τουλάχιστον 1 νεογνό). Τα ζώα της κοόρτης 2A θα πρέπει να υποβάλλονται σε δοκιμασία αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα, δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών (functional observational battery/FOB), δοκιμασία κινητικής δραστηριότητας (βλ. παραγράφους 48-50) και νευροπαθολογική αξιολόγηση (βλ. παραγράφους 74-75). Θα πρέπει να καταβάλλονται προσπάθειες ώστε οι διακυμάνσεις όλων των συνθηκών δοκιμής να είναι ελάχιστες και να μη σχετίζονται συστηματικά με την αγωγή. Μεταξύ των μεταβλητών που μπορούν να επηρεάσουν τη συμπεριφορά συγκαταλέγονται η στάθμη ήχου (π.χ. διαλείπων θόρυβος), η θερμοκρασία, η υγρασία, ο φωτισμός, οι οσμές, η ώρα της ημέρας και οι περισπασμοί από το περιβάλλον. Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών νευροτοξικότητας θα πρέπει να ερμηνεύονται σε σχέση με κατάλληλα πεδία τιμών αναφοράς για ιστορικούς μάρτυρες. Τα ζώα της κοόρτης 2B θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για νευροπαθολογική αξιολόγηση την 21η ή 22η ΜΓΗ (βλ. παραγράφους 74-75).
48. Την 24η ΜΓΗ (± 1 ημέρα) θα πρέπει να εκτελείται δοκιμασία αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα σε ζώα της κοόρτης 2A. Η ημέρα της δοκιμασίας θα πρέπει να είναι αντισταθμισμένη μεταξύ των ομάδων αγωγής και της ομάδας μαρτύρων. Κάθε συνεδρία περιλαμβάνει 50 δοκιμασίες. Κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα, θα πρέπει να προσδιορίζεται το μέσο μέγεθος της αντίδρασης σε κάθε σειρά 10 δοκιμασιών (5 σειρές των 10 δοκιμασιών) και να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες δοκιμής ώστε να επιτυγχάνεται ενδοσυνεδριακή εξοικείωση. Οι διαδικασίες αυτές θα πρέπει να συνάδουν με τη μέθοδο δοκιμών B.53 (35).
49. Σε κατάλληλη χρονική στιγμή μεταξύ της 63ης και της 75ης ΜΓΗ, τα ζώα της κοόρτης 2A υποβάλλονται σε δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών και αυτόματη δοκιμασία κινητικής δραστηριότητας. Οι διαδικασίες αυτές θα πρέπει να συνάδουν με τις μεθόδους δοκιμών B.43 (33) και B.53 (35). Η δέσμη παρατηρήσεων λειτουργιών περιλαμβάνει ενδελεχή περιγραφή της όψης, της συμπεριφοράς και της λειτουργικής αρτιότητας του υποκειμένου, που αξιολογούνται μέσω παρατηρήσεων στον κλωβό στέγασης, αφού προηγηθεί μεταφορά σε τυπικό πεδίο παρατήρησης (ανοικτός χώρος) όπου το ζώο κινείται ελεύθερα, και μέσω δοκιμασιών χειραγώγησης. Οι δοκιμασίες θα πρέπει να εκτελούνται από τη λιγότερο προς την περισσότερο διαδραστική. Κατάλογος μετρήσεων παρατίθεται στο προσάρτημα 1. Όλα τα ζώα θα πρέπει να παρατηρούνται με προσοχή από εκπαιδευμένους παρατηρητές που δεν γνωρίζουν την αγωγή στην οποία υποβάλλονται τα ζώα, με τη χρήση τυποποιημένων διαδικασιών ώστε να ελαχιστοποιείται η μεταβλητότητα μεταξύ των παρατηρητών. Εφόσον είναι δυνατόν, συνιστάται να αξιολογεί ο ίδιος παρατηρητής όλα τα ζώα σε δεδομένη δοκιμασία. Εάν αυτό δεν είναι δυνατόν, απαιτείται κάποιου είδους απόδειξη της αξιοπιστίας μεταξύ των παρατηρητών. Για κάθε παράμετρο της δέσμης παρατηρήσεων λειτουργιών, πρέπει να χρησιμοποιούνται σαφείς, επιχειρησιακά καθορισμένες κλίμακες και κριτήρια βαθμολόγησης. Εάν είναι δυνατόν, θα πρέπει να αναπτύσσονται αντικειμενικές ποσοτικές μετρήσεις για τα τελικά σημεία παρατήρησης τα οποία περιλαμβάνουν υποκειμενική κατάταξη. Όσον αφορά την κινητική δραστηριότητα, κάθε ζώο θα πρέπει να εξετάζεται χωριστά. Η συνεδρία δοκιμασίας θα πρέπει να έχει αρκετή διάρκεια ώστε να καταδεικνύεται η ενδοσυνεδριακή εξοικείωση των μαρτύρων. Η κινητική δραστηριότητα θα πρέπει να παρακολουθείται με συσκευή αυτόματης καταγραφής δραστηριοτήτων, ικανή να ανιχνεύει τόσο τις αυξήσεις όσο και τις μειώσεις τους (δηλ. η δραστηριότητα γραμμής βάσης που μετράται από τη συσκευή δεν θα πρέπει να είναι τόσο χαμηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση μειώσεων ούτε τόσο υψηλή ώστε να αποκλείεται η ανίχνευση αυξήσεων της δραστηριότητας). Κάθε συσκευή θα πρέπει να ελέγχεται με τυποποιημένες διαδικασίες ώστε να διασφαλίζεται, στο μέτρο του δυνατού, η αξιοπιστία της λειτουργίας όλων των συσκευών, όλες τις ημέρες. Εφόσον είναι δυνατόν, οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι ισορροπα κατανεμημένες στις διάφορες συσκευές. Οι ομάδες αγωγής θα πρέπει να είναι αντισταθμισμένες ως προς τους χρόνους εξέτασης ώστε να αποφεύγονται πειραματικά σφάλματα οφειλόμενα στους κirkάδιους ρυθμούς.
50. Εάν οι υφιστάμενες πληροφορίες καθιστούν αναγκαία τη διεξαγωγή και άλλων δοκιμασιών λειτουργιών (π.χ. αισθητηριακών, κοινωνικών, γνωσιακών), η ενσωμάτωσή τους δεν θα πρέπει να θίγει την αρτιότητα των λοιπών άλλων αξιολογήσεων που διενεργούνται στο πλαίσιο της μελέτης. Εάν οι δοκιμασίες αυτές εκτελούνται στα ίδια ζώα όπως οι τυπικές δοκιμασίες αιφνιδιασμού από ακουστικό ερέθισμα, δέσμης παρατηρήσεων λειτουργιών και κινητικής δραστηριότητας, θα

πρέπει να προγραμματίζονται διαφορετικές δοκιμασίες ώστε να ελαχιστοποιείται ο κίνδυνος να θιγεί η αρτιότητα των εν λόγω δοκιμασιών. Οι συμπληρωματικές διαδικασίες ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στις περιπτώσεις όπου οι εμπειρικές παρατηρήσεις, οι αναμενόμενες επιδράσεις ή ο μηχανισμός/τρόπος δράσης υποδηλώνουν συγκεκριμένο τύπο νευροτοξικότητας.

Αξιολόγηση της δυνητικής αναπτυξιακής ανοσοτοξικότητας (κοόρτη 3)

51. Την 56η ΜΓΗ (± 3 ημέρες) θα πρέπει να χρησιμοποιούνται 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κοόρτης 3 από κάθε ομάδα αγωγής (τυχαία επιλογή 1 αρσενικού ή 1 θηλυκού ανά γέννα, εκπροσώπηση όλων των γεννών από τουλάχιστον 1 νεογνό) σε προσδιορισμό εξαρτώμενης από τα κύτταρα Τ απόκρισης αντισωμάτων, δηλ. ήτοι της κύριας απόκρισης των αντισωμάτων IgM σε ένα εξαρτώμενο από τα κύτταρα Τ αντιγόνο, όπως τα ερυθροκύτταρα προβάτου (SRBC) ή η αιμοκυανίνη του μαλακίου *Megathura crenula* (Keyhole Limpet Hemocyanin/KLH), σύμφωνα με τις υφιστάμενες διαδικασίες δοκιμών ανοσοτοξικότητας (14) (15). Η απόκριση μπορεί να αξιολογηθεί με την καταμέτρηση συγκεκριμένων κυττάρων που σχηματίζουν πλάκες (PFC) στον σπλήνα ή με τον προσδιορισμό του τίτλου των ειδικών αντισωμάτων IgM που συνδέονται με τα SRCM ή την KLH στον ορό, με τεχνική ELISA κατά την κορύφωση της απόκρισης. Η απόκριση κορυφώνεται συνήθως τέσσερις (PFC) ή πέντε (ELISA) ημέρες μετά την ενδοφλέβια ανοσοποίηση. Εάν η κύρια απόκριση των αντισωμάτων προσδιορίζεται με καταμέτρηση των κυττάρων που σχηματίζουν πλάκες, επιτρέπεται η αξιολόγηση υποομάδων των ζώων σε διαφορετικές ημέρες, υπό τον όρο ότι η ανοσοποίηση και η θανάτωση σε επίπεδο υποομάδας προγραμματίζονται κατά τρόπο ώστε τα PFC να μετρώνται κατά την κορύφωση της απόκρισης και ότι οι υποομάδες περιέχουν ιαριθμούς αρσενικούς και θηλυκούς απογόνους από όλες τις ομάδες δόσης, συμπεριλαμβανομένων των μαρτύρων, και αξιολογούνται κατά την ίδια περίπου μεταγεννητική ημέρα. Η έκθεση στην ελεγχόμενη χημική ουσία συνεχίζεται έως την προηγούμενη ημέρα από τη συλλογή του σπλήνα για την καταμέτρηση των PFC ή ορού για τον προσδιορισμό ELISA.

Συνέχεια στην αξιολόγηση της δυνητικής τοξικότητας στην αναπαραγωγή (κοόρτη 1B)

52. Εάν είναι απαραίτητο, τα ζώα της κοόρτης 1B μπορούν να συνεχίσουν να λαμβάνουν αγωγή και μετά την 90ή ΜΓΗ και να αναπαράχθουν για τη λήψη γενεάς F₂. Τα αρσενικά και τα θηλυκά ζώα της ίδιας ομάδας δόσης θα πρέπει να συμβιώνουν (χωρίς να σχηματίζονται ζεύγη ζώων της ίδιας γέννας) για μέγιστο χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων, το οποίο αρχίζει την 90ή ΜΓΗ ή αργότερα αλλά όχι μετά την 120ή ΜΓΗ. Οι διαδικασίες θα πρέπει να είναι παρόμοιες με αυτές που εφαρμόζονται για τα ζώα P. Ωστόσο, βάσει του βάρους της μαρτυρίας, ενδέχεται να αρκεί η θανάτωση των νεογνών την 4η ΜΓΗ αντί της παρακολούθησής τους έως τον απογαλακτισμό ή και πέραν αυτού.

ΤΕΛΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

Κλινική βιοχημεία/αιματολογία

53. Θα πρέπει να παρακολουθούνται οι συστηματικές επιδράσεις στα ζώα P. Κατά τη λήξη της μελέτης λαμβάνονται δείγματα αίματος μετά από νηστεία από καθορισμένο σημείο του σώματος δέκα τυχαία επιλεγμένων αρσενικών και θηλυκών ζώων P ανά ομάδα δόσης, φυλάσσονται υπό κατάλληλες συνθήκες και υποβάλλονται σε μερικές ή πλήρεις αιματολογικές και κλινικές βιοχημικές εξετάσεις, προσδιορισμό θυροξίνης (T4) και θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) ή άλλες εξετάσεις που υπαγορεύονται από τις γνωστές επιδράσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)]. Θα πρέπει να εξετάζονται οι ακόλουθες αιματολογικές παράμετροι: αιματοκρίτης, συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης, αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων, λευκών αιμοσφαιρίων και λευκοκυτταρικός τύπος, αριθμός αιμοπεταλίων και χρόνος/δυναμικό πήξης του αίματος. Οι εξετάσεις στο πλάσμα ή στον ορό του αίματος θα πρέπει να περιλαμβάνουν προσδιορισμό γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης, ουρίας, κρεατινίνης, ολικών πρωτεϊνών, λευκωματίνης και δύο τουλάχιστον ενζύμων ενδεικτικών ηπατοκυτταρικής επίδρασης (όπως η αλανινο-αμινοτρανσφεράση, η ασπαραγινική αμινοτρανσφεράση, η αλκαλική φωσφατάση, η γ-γλουταμυλοτρανσπεπτιδάση και η αφυδρογονάση της σορβιτόλης). Σε ορισμένες περιπτώσεις η μέτρηση και άλλων ενζύμων και των χολικών οξέων είναι δυνατόν να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες. Επιπλέον, μπορεί να ληφθεί αίμα από όλα τα ζώα και να φυλαχθεί με σκοπό να χρησιμοποιηθεί σε ενδεχόμενη μεταγενέστερη ανάλυση για τη διασαφήνιση αμφίσημων επιδράσεων ή την παραγωγή δεδομένων εσωτερικής έκθεσης. Εάν δεν προβλέπεται δεύτερο ζευγάρι των ζώων P, τα δείγματα αίματος λαμβάνονται αμέσως πριν από τη διαδικασία της προγραμματισμένης θανάτωσης ή στο πλαίσιο αυτής. Εάν διατηρούνται ζώα, τα δείγματα αίματος λαμβάνονται λίγες ημέρες πριν από το δεύτερο ζευγάρι των ζώων. Πριν από την λήξη της μελέτης θα πρέπει να γίνεται ανάλυση ούρων και να αξιολογούνται οι ακόλουθες παράμετροι, εκτός εάν τα υφιστάμενα δεδομένα από μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση δείχνουν ότι δεν επηρεάζονται από την ελεγχόμενη χημική ουσία: εμφάνιση, όγκος, ωσμωτικότητα ή ειδικό βάρος, pH, πρωτεΐνες, γλυκόζη, αίμα και αιμοσφαίρια, κυτταρικά υπολείμματα. Ούρα μπορούν επίσης να συλλέγονται για την παρακολούθηση της έκκρισης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και/ή των μεταβολιτών.
54. Θα πρέπει επίσης να παρακολουθούνται οι συστηματικές επιδράσεις στα ζώα F₁. Κατά τη λήξη της μελέτης λαμβάνονται δείγματα αίματος μετά από νηστεία από καθορισμένο σημείο του σώματος δέκα τυχαία επιλεγμένων αρσενικών και θηλυκών ζώων της κοόρτης A1 ανά ομάδα δόσης, φυλάσσονται υπό κατάλληλες συνθήκες και υποβάλλονται στις τυπικές κλινικές βιοχημικές εξετάσεις, συμπεριλαμβανομένης της αξιολόγησης των επιπέδων θυρεοειδικών ορμονών στον ορό (T4 και TSH), αιματολογικές εξετάσεις (αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, λευκοκυτταρικός τύπος και αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων) και ανάλυση ούρων.

55. Τα πλεονάζοντα την 4η ΜΓΗ νεογνά υποβάλλονται σε νεκροψία-νεκροτομή και εξετάζεται το ενδεχόμενο μέτρησης των συγκεντρώσεων της θυρεοειδικής ορμόνης θυροξίνης (T4) στον ορό. Εάν είναι απαραίτητο, τα δείγματα αίματος νεογνών (4η ΜΓΗ) μπορούν να συνενώνονται ανά γέννα για βιοχημικές εξετάσεις/αναλύσεις θυρεοειδικών ορμονών. Συλλέγεται επίσης αίμα για ανάλυση T4 και TSH από τα απογαλακτισμένα ζώα που υποβάλλονται σε νεκροψία-νεκροτομή την 22η ΜΓΗ (νεογνά F₁ που δεν έχουν επιλεγεί για τις κούρτες).

Παράμετροι του σπέρματος

56. Θα πρέπει να μετρώνται οι παράμετροι του σπέρματος σε όλα τα αρσενικά ζώα της γενεάς P, εκτός εάν υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι αυτές δεν επηρεάζονται σε μελέτη 90 ημερών. Θα πρέπει να υποβάλλονται σε εξέταση παραμέτρων του σπέρματος όλα τα αρσενικά ζώα της κούρτης 1A.
57. Κατά τη λήξη της μελέτης καταγράφεται το βάρος των όρχεων και των επιδιδυμίδων όλων των αρσενικών ζώων P και F₁ (κούρτη 1A). Τουλάχιστον ένας όρχις και μία επιδιδυμίδα φυλάσσονται για ιστοπαθολογική εξέταση. Η εναπομένουσα επιδιδυμίδα χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση του σπερματικού αποθέματος της ουράς της (16) (17). Επιπλέον, συλλέγεται σπέρμα από την ουρά της επιδιδυμίδας (ή τον σπερματικό πόρο), με μεθόδους που ελαχιστοποιούν τις βλάβες, για την αξιολόγηση της κινητικότητας και της μορφολογίας του σπέρματος (18).
58. Η κινητικότητα του σπέρματος μπορεί είτε να αξιολογείται άμεσα μετά τη θανάτωση είτε να καταγράφεται για μεταγενέστερη ανάλυση. Το ποσοστό των προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων μπορεί να προσδιοριστεί είτε υποκειμενικά είτε αντικειμενικά, με υποβοηθούμενη από υπολογιστή ανάλυση κίνησης, (19) (20) (21) (22) (23) (24). Για τη μορφολογική αξιολόγηση του σπέρματος, θα πρέπει να εξετάζεται δείγμα σπέρματος από την επιδιδυμίδα (ή τον σπερματικό πόρο) ως μονιμοποιημένο ή υγρό παρασκεύασμα (25) και τουλάχιστον 200 σπερματοζωάρια ανά δείγμα να ταξινομούνται ως φυσιολογικά (τόσο η κεφαλή όσο και το μέσο τμήμα/η ουρά φαίνονται φυσιολογικά) ή ανώμαλα. Παραδείγματα μορφολογικών ανωμαλιών των σπερματοζωαρίων είναι η σύντηξη, η παρουσία απομονωμένων κεφαλών και η παραμόρφωση κεφαλών και/ή ουρών (26). Οι παραμορφωμένες ή μεγάλες κεφαλές σπερματοζωαρίων ενδέχεται να υποδηλώνουν ελαττωματική σπερμιάση.
59. Εάν κατά τη νεκροψία καταψυχθούν δείγματα σπέρματος, μονιμοποιηθούν επιχρίσματα και καταγραφούν εικόνες για ανάλυση της κινητικότητας του σπέρματος (27), η μέτεπειτα ανάλυση μπορεί να περιοριστεί στις ομάδες μαρτύρων και υψηλής δόσης. Ωστόσο, εάν έχουν παρατηρηθεί επιδράσεις σχετιζόμενες με την αγωγή, θα πρέπει να αξιολογούνται και οι ομάδες χαμηλότερης δόσης.

Νεκροψία-νεκροτομή

60. Κατά τη λήξη της μελέτης ή σε περίπτωση πρόωρου θανάτου, όλα τα ζώα P και F₁ νεκροτομούνται και εξετάζονται μακροσκοπικά για ανατομικές ανωμαλίες ή παθολογικές αλλαγές. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στα όργανα του αναπαραγωγικού συστήματος. Τα νεογνά που θανατώνονται ανώδυνα επειδή είναι ετοιμοθάνατα και τα νεκρά νεογνά θα πρέπει να καταγράφονται και, όταν δεν διαβρέχονται, να εξετάζονται για πιθανές διαμαρτίες και/ή για τη διαπίστωση της αιτίας θανάτου και να συντηρούνται.
61. Στα ενήλικα θηλυκά ζώα P και F₁, εξετάζεται κολπικό επίχρισμα την ημέρα της νεκροψίας για να προσδιοριστεί το στάδιο του οιστρικού κύκλου και να καταστεί δυνατή η συσχέτιση με ιστοπαθολογικά ευρήματα στα όργανα αναπαραγωγής. Οι μήτρες όλων των θηλυκών ζώων P (και των θηλυκών F₁, κατά περίπτωση) εξετάζονται ως προς την παρουσία και τον αριθμό θέσεων εμφύτευσης, κατά τρόπο ώστε να μη διακυβεύεται η ιστοπαθολογική αξιολόγηση.

Βάρος οργάνων και διατήρηση ιστών — ενήλικα ζώα P και F₁

62. Κατά τη λήξη της μελέτης, προσδιορίζονται το βάρος σώματος και το βάρος, σε νωπή κατάσταση, των οργάνων που απαριθμούνται κατωτέρω, σε όλα τα ζώα P και όλα τα ενήλικα ζώα F₁ από τις οικείες κούρτες (όπως περιγράφεται κατωτέρω), το συντομότερο δυνατό μετά την ανατομή ώστε να αποφεύγεται η ξήρανση. Τα όργανα αυτά θα πρέπει έπειτα να συντηρούνται σε κατάλληλες συνθήκες. Εκτός αντιθετων διατάξεων, τα όργανα σε ζεύγη μπορούν να ζυγίζονται χωριστά ή μαζί, σύμφωνα με τη συνήθη πρακτική του εργαστηρίου που εκτελεί τη δοκιμή.

— μήτρα (με τις σάλπιγγες και τον τράχηλο), ωθήκες·

— όρχις, επιδιδυμίδες (ολική επιδιδυμίδα και ουρά της επιδιδυμίδας για τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για καταμέτρηση του σπέρματος)·

— προστάτης (πλαγιοραχιαίο και κοιλιακό τμήμα μαζί). Το σύμπλεγμα του προστάτη θα πρέπει να απαλλάσσεται με προσοχή από τους περιττούς ιστούς ώστε να μην προκαλείται διάτρηση των σπερματοδόχων κύστεων που είναι γεμάτες υγρό. Σε περίπτωση σχετικών με την αγωγή επιδράσεων στο συνολικό βάρος του προστάτη, το πλαγιοραχιαίο και του κοιλιακού τμήμα θα πρέπει να ανατέμνονται επιμελώς μετά τη μονιμοποίηση και να ζυγίζονται χωριστά·

- σπερματοδόχοι κύστεις με τους πηκτοειδείς αδένες και τα υγρά τους (ως μία μονάδα)·
 - εγκέφαλος, ήπαρ, νεφροί, καρδιά, σπλήνας, θύμος αδένας, υπόφυση, θυρεοειδής (μετά από μονιμοποίηση), επινεφρίδια και τα όργανα ή ιστοί που αποτελούν γνωστό στόχο.
63. Πέραν των οργάνων που απαριθμούνται θα πρέπει να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες δείγματα περιφερειακών νευρών, μυών, νωπιαίου μυελού, οφθαλμού μαζί με το οπτικό νεύρο, του γαστρεντερικού συστήματος, της ουροδόχου κύστης, των πνευμόνων, της τραχείας (με τον θυρεοειδή και τον παραθυρεοειδή), του μυελού των οστών, του σπερματικού πόρου (αρσενικά ζώα), του μαστικού αδένος (αρσενικά και θηλυκά ζώα) και του κόλπου.
64. Ζυγίζονται και διατηρούνται για ιστοπαθολογικές εξετάσεις όλα τα όργανα των ζώων της κούρτης 1Α.
65. Για τη διερεύνηση των ανοσοτοξικών επιδράσεων που επάγονται πριν και μετά τη γέννηση, 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κούρτης 1Α από κάθε ομάδα αγωγής (τυχαία επιλογή 1 αρσενικού ή 1 θηλυκού ανά γέννα, εκπροσώπηση όλων των γεννών από 1 τουλάχιστον νεογνό) υποβάλλονται στα ακόλουθα κατά τη λήξη της μελέτης:
- ζύγιση των λεμφαδένων που συνδέονται με την οδό έκθεσης και βρίσκονται σε απόσταση από αυτή (επιπλέον της ζύγισης των επινεφριδίων, του θύμου αδένος και του σπλήνα όλων των ζώων της κούρτης 1Α, που έχει ήδη πραγματοποιηθεί)·
 - ανάλυση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων του σπλήνα (λεμφοκύτταρα T CD4+ και CD8+, λεμφοκύτταρα Β και φυσικά φονικά κύτταρα) στο ένα ήμισυ του οργάνου, ενώ το δεύτερο διατηρείται για ιστοπαθολογική αξιολόγηση.
- Με την ανάλυση υποπληθυσμών λεμφοκυττάρων του σπλήνα σε μη ανοσοποιημένα ζώα (κούρτη 1Α) προσδιορίζεται αν η έκθεση σχετίζεται με αλλαγή στη σταθερή ανοσολογική κατανομή των προερχόμενων από τον θύμο αδένος βοηθητικών (CD4+) ή κυτταροτοξικών (CD8+) λεμφοκυττάρων ή των φυσικών φονικών κυττάρων (ταχείες αντιδράσεις σε νεοπλασματικά κύτταρα και παθογόνους παράγοντες).
66. Στα ζώα της κούρτης 1Β θα πρέπει να ζυγίζονται τα ακόλουθα όργανα και να υποβάλλονται σε επεξεργασία οι αντίστοιχοι ιστοί έως το στάδιο των κύβων:
- κόλπος (χωρίς ζύγιση),
 - μήτρα με τον τράχηλο,
 - ωοθήκες,
 - όρχεις (τουλάχιστον ένας),
 - επιδιδυμίδες,
 - σπερματοδόχοι κύστεις και πηκτοειδείς αδένες,
 - προστάτης,
 - υπόφυση,
 - προσδιορισμένα όργανα-στόχοι.

Εάν τα αποτελέσματα της κούρτης 1Α είναι αμφίσημα ή σε περίπτωση υπονοιών για τοξικές για το αναπαραγωγικό και το ενδοκρινικό σύστημα ουσίες, θα πρέπει να εκτελούνται ιστοπαθολογικές εξετάσεις στην κούρτη 1Β.

67. Κούρτες 2Α και 2Β: δοκιμές αναπτυξιακής νευροτοξικότητας (την 21η ή 22η ΜΓΗ και σε ενήλικους απογόνους). Τα ζώα της κούρτης 2Α θανατώνονται μετά τις δοκιμασίες συμπεριφοράς, καταγράφεται το βάρος του εγκέφαλου τους και ακολουθεί πλήρης νευρο-ιστοπαθολογική εξέταση για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Τα ζώα της κούρτης 2Β θανατώνονται την 21η ή την 22η ΜΓΗ, καταγράφεται το βάρος του εγκέφαλου τους και ακολουθεί μικροσκοπική εξέταση του εγκέφαλου για την αξιολόγηση της νευροτοξικότητας. Για τα ζώα της κούρτης 2Α απαιτείται μονιμοποίηση με έγχυση, η οποία είναι προαιρετική για τα ζώα της κούρτης 2Β, όπως προβλέπεται στη μέθοδο δοκιμών Β.53 (35).

Βάρος οργάνων και διατήρηση ιστών — απογαλακτισμένα ζώα F₁

68. Τα νεογνά που δεν επιλέγονται για τις κούρτες, συμπεριλαμβανομένων των καχεκτικών ζώων, θανατώνονται μετά τον απογαλακτισμό, την 22η ΜΓΗ, εκτός εάν τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω διερευνήσεων σε ζωντανά ζώα. Τα νεογνά που θανατώνονται υποβάλλονται σε νεκροψία-νεκροτομή, που περιλαμβάνει αξιολόγηση των αναπαραγωγικών τους οργάνων, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 62 και 63. Θα πρέπει να ζυγίζονται και να διατηρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες ο εγκέφαλος, ο σπλήνας και ο θύμος αδένος έως 10 νεογνών ανά φύλο και ανά ομάδα, προερχόμενων από όσο το δυνατόν περισσότερες γέννες. Επιπλέον, είναι δυνατόν να διατηρούνται οι μαστικοί ιστοί αυτών των αρσενικών και θηλυκών νεογνών για περαιτέρω μικροσκοπική ανάλυση⁽¹⁾ [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)]. Οι μακροσκοπικές ανωμαλίες και οι ιστοί-στόχοι θα πρέπει να φυλάσσονται για ενδεχόμενη ιστολογική εξέταση.

⁽¹⁾ Οι έρευνες έχουν δείξει ότι ο μαστικός αδένος, ιδίως στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του, αποτελεί ευαίσθητο τελικό σημείο όσον αφορά την οιστρογονική δράση. Συνιστάται να συμπεριληφθούν στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, όταν επικυρωθούν, τελικά σημεία που περιλαμβάνουν μαστικούς αδένες νεογνών και των δύο φύλων.

Ιστοπαθολογία — ζώα P

69. Για όλα τα ζώα P των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων εκτελούνται πλήρεις ιστοπαθολογικές εξετάσεις των οργάνων που απαριθμούνται στις παραγράφους 62 και 63. Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα όργανα που εμφανίζουν σχετιζόμενες με την αγωγή αλλαγές από όλα τα ζώα των ομάδων χαμηλότερης δόσης, για να υποβοηθηθεί ο προσδιορισμός του ΝΟΑΕΛ. Επιπλέον, θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστοπαθολογική αξιολόγηση τα αναπαραγωγικά όργανα όλων των ζώων για τα οποία υπάρχουν υπόνοιες μειωμένης γονιμότητας, π.χ. εκείνα στα οποία απέτυχε το ζευγάρωμα, η σύλληψη, ο τοκετός ή η γέννηση υγιών απογόνων, ή στα οποία επηρεάστηκε η κυκλικότητα του οίστρου ή ο αριθμός, η κινητικότητα ή η μορφολογία των σπερματοζωαρίων, καθώς και όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις.

Ιστοπαθολογία — ζώα F₁*Ζώα της 1ης κούρτης*

70. Για όλα τα ενήλικα ζώα των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων της κούρτης 1Α εκτελούνται πλήρεις ιστοπαθολογικές εξετάσεις των οργάνων που απαριθμούνται στις παραγράφους 62 και 63. Θα πρέπει να εκπροσωπούνται όλες οι γέννες από 1 τουλάχιστον νεογνό ανά φύλο. Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα όργανα και οι ιστοί που εμφανίζουν σχετιζόμενες με την αγωγή αλλαγές, καθώς και όλες οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις, από όλα τα ζώα των ομάδων χαμηλότερης δόσης για να υποβοηθηθεί ο προσδιορισμός του ΝΟΑΕΛ. Για την αξιολόγηση των επιδράσεων που επάγονται πριν και μετά τη γέννηση στα λεμφικά όργανα, θα πρέπει επίσης να αξιολογούνται από ιστοπαθολογικής πλευράς οι λεμφαδένες και ο μυελός των οστών που έχουν συλλεγεί από 10 αρσενικά και 10 θηλυκά ζώα της κούρτης 1Α, παράλληλα με την ήδη διενεργηθείσα ιστοπαθολογική αξιολόγηση του θύμου αδένα, του σπλήνα και των επινεφριδίων όλων των ζώων της κούρτης 1Α.
71. Σε περίπτωση υπονοιών για τοξικές για το αναπαραγωγικό ή το ενδοκρινικό σύστημα ουσίες, θα πρέπει να υποβάλλονται σε ιστοπαθολογικές εξετάσεις αναπαραγωγικοί και ενδοκρινικοί ιστοί από όλα τα ζώα της κούρτης 1Β, οι οποίοι έχουν υποστεί επεξεργασία έως το στάδιο του κύβου, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 66. Ιστοπαθολογικές εξετάσεις πρέπει επίσης να γίνονται στην κούρτη 1Β, εάν τα αποτελέσματα της κούρτης 1Α είναι αμφίσημα.
72. Οι ωθήκες των ενήλικων θηλυκών ζώων πρέπει κανονικά να περιέχουν αρχέγονα και αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, καθώς και ωχρά σωματίδια. Επομένως, η ιστοπαθολογική εξέταση θα πρέπει να στοχεύει στην ποσοτική αξιολόγηση των αρχέγονων και των μικρών αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, καθώς και των ωχρών σωματίων, στα θηλυκά ζώα F₁. Ο αριθμός των ζώων, η επιλογή των τομών ωοθηκών και το μέγεθος του δείγματος τομής θα πρέπει να είναι στατιστικά κατάλληλα για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο αξιολόγησης. Τα ωοθυλάκια θα πρέπει να καταμετρώνται πρώτα στα ζώα των ομάδων μαρτύρων και υψηλής δόσης και, στην περίπτωση δυσμενούς επίδρασης στην ομάδα υψηλής δόσης, θα πρέπει να εξετάζονται οι χαμηλότερες δόσεις. Η εξέταση θα πρέπει να περιλαμβάνει καταμέτρηση των αρχέγονων ωοθυλακίων, στην οποία μπορούν να προστίθενται τα μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, με σκοπό τη σύγκριση των ωοθηκών των ζώων των ομάδων αγωγής και μαρτύρων [βλ. καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 151 του ΟΟΣΑ (40)]. Η αξιολόγηση των ωχρών σωματίων θα πρέπει να διενεργείται παράλληλα με τον έλεγχο της κυκλικότητας του οίστρου, ώστε να μπορεί να ληφθεί υπόψη στην αξιολόγηση το στάδιο του κύκλου. Εξετάζονται οι σάλπιγγες, η μήτρα και ο κόλπος για να διαπιστωθεί η ορθή οργανοτυπική ανάπτυξη.
73. Εκτελούνται λεπτομερείς ιστοπαθολογικές εξετάσεις των όρχεων των αρσενικών ζώων F₁ για να εντοπιστούν σχετιζόμενες με την αγωγή επιδράσεις στη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των όρχεων και στη σπερματογένεση (38). Όταν είναι δυνατόν, θα πρέπει να εξετάζονται τομές του ορχικού δικτύου. Εξετάζονται η κεφαλή, το σώμα και η ουρά της επιδιδυμίδας, καθώς και ο σπερματικός πόρος, για να διαπιστωθεί η ορθή οργανοτυπική ανάπτυξη και να ελεγχθούν οι παράμετροι που απαιτούνται για τα αρσενικά ζώα P.

Ζώα της 2ης κούρτης

74. Μετά την ολοκλήρωση των νευροσυμπεριφορικών δοκιμασιών (μετά την 75η ΜΓΗ αλλά όχι πέραν της 90ής), εκτελούνται νευρο-ιστοπαθολογικές εξετάσεις για όλα τα ζώα των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων της κούρτης 2Α ανά φύλο. Την 21η ή 22η ΜΓΗ εκτελούνται ιστοπαθολογικές εξετάσεις του εγκεφάλου όλων των ζώων των ομάδων υψηλής δόσης και μαρτύρων της κούρτης 2Β ανά φύλο. Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται τα όργανα ή οι ιστοί που εμφανίζουν σχετιζόμενες με την αγωγή αλλαγές από τα ζώα των ομάδων χαμηλότερης δόσης για να υποβοηθηθεί ο προσδιορισμός του ΝΟΑΕΛ. Στις κούρτες 2Α και 2Β εξετάζονται πολλαπλές τομές του εγκεφάλου των ζώων, ώστε να καλύπτονται οι σφρηκτικοί βολβοί, ο εγκεφαλικός φλοιός, ο ιππόκαμπος, τα βασικά γάγγλια, ο θάλαμος, ο υποθάλαμος, ο μεσεγκέφαλος (τετράδυμο, καλύπτρα και εγκεφαλικά σκέλη), το εγκεφαλικό στέλεχος και η παρεγκεφαλίδα. Μόνο στην κούρτη 2Α εξετάζονται οι οφθαλμοί (αμφιβληστροειδής και οπτικό νεύρο) και δείγματα περιφερειακών νεύρων, μύων και νωτιαίου μυελού. Όλες οι νευρο-ιστολογικές διαδικασίες θα πρέπει να συνάδουν με τη μέθοδο δοκιμών B.53 (35).
75. Θα πρέπει να διενεργούνται μορφομετρικές (ποσοτικές) αξιολογήσεις σε αντιπροσωπευτικά τμήματα του εγκεφάλου (ομόλογες τομές, προσεκτικά επιλεγμένες βάσει αξιόπιστων μικροσκοπικών σημείων αναφοράς), οι οποίες ενδέχεται να περιλαμβάνουν γραμμικές και/ή εμβαδικές μετρήσεις συγκεκριμένων εγκεφαλικών περιοχών. Θα πρέπει να λαμβάνονται τουλάχιστον τρεις διαδοχικές τομές σε κάθε σημείο αναφοράς (επίπεδο) ώστε να επιλέγεται η πλέον ομόλογη και αντιπροσωπευτική τομή για το συγκεκριμένο τμήμα του εγκεφάλου που πρόκειται να αξιολογηθεί. Ο νευροπαθολόγος θα πρέπει να κρίνει κατάλληλος αν οι τομές που έχουν ετοιμαστεί για μέτρηση είναι ομόλογες με τις υπόλοιπες άλλες του συνόλου του δείγματος και, επομένως, κατάλληλες να συμπεριληφθούν στη μελέτη, δεδομένου ότι οι γραμμικές

μετρήσεις, ιδιαίτερα, μπορεί να μεταβάλλονται σε σχετικά μικρή απόσταση (28). Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τομές που δεν είναι ομόλογες. Παρόλο που στόχος είναι η δειγματοληψία από όλα τα ζώα που διατηρούνται για τον σκοπό αυτό (10/φύλο/επίπεδο δόσης), ενδέχεται να αρκούν μικρότεροι αριθμοί. Ωστόσο, εάν τα δείγματα προέρχονται από λιγότερα από 6 ζώα/φύλο/επίπεδο δόσης, δεν θεωρούνται γενικά επαρκή για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου δοκιμών. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στερεολογία για τον προσδιορισμό σχετικών με την αγωγή επιδράσεων σε παραμέτρους όπως ο όγκος ή ο αριθμός κυττάρων συγκεκριμένων νευροανατομικών περιοχών. Θα πρέπει να εφαρμόζεται αντισταθμισμένος σχεδιασμός σε κάθε πτυχή της προετοιμασίας των δειγμάτων ιστών, από τη μονιμοποίηση των ιστών και την ανατομή δειγμάτων έως την επεξεργασία τους και τη χρώση των αντικειμενοφόρων πλακών, ώστε κάθε παρτίδα να περιέχει αντιπροσωπευτικά δείγματα από κάθε ομάδα δόσης. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν μορφομετρικές ή στερεολογικές αναλύσεις, οι εγκεφαλικοί ιστοί θα πρέπει να στερεώνονται σε κατάλληλα μέσα σε όλα τα επίπεδα δόσης ταυτόχρονα, ώστε να αποφεύγονται τεχνικά σφάλματα λόγω συστολής που συνδέονται με την παρατεταμένη φύλαξη σε μέσο μονιμοποίησης.

ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Δεδομένα

76. Τα δεδομένα αναφέρονται ατομικά και συνοψίζονται σε μορφή πίνακα. Κατά περίπτωση, θα πρέπει να αναφέρονται τα ακόλουθα για κάθε ομάδα δοκιμής και κάθε γενέα: αριθμός ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, αριθμός ζώων που βρέθηκαν νεκρά κατά τη διάρκεια της δοκιμής ή θανατώθηκαν για να μην υποφέρουν, χρόνος θανάτου ή ευθανασίας, αριθμός γόνιμων ζώων, αριθμός κυοφορούντων θηλυκών, αριθμός θηλυκών που γέννησαν απογόνους και αριθμός ζώων που εμφάνισαν σημεία τοξικότητας. Θα πρέπει επίσης να παρατίθεται περιγραφή της τοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων του χρόνου εκδήλωσης, της διάρκειας και της σοβαρότητάς της.
77. Τα αριθμητικά αποτελέσματα θα πρέπει να αξιολογούνται με κατάλληλη και αποδεκτή στατιστική μέθοδο. Οι στατιστικές μέθοδοι θα πρέπει να επιλέγονται στο πλαίσιο του σχεδιασμού της μελέτης και να καλύπτουν δεόντως τα μη κανονικά δεδομένα (π.χ. δεδομένα καταμέτρησης), τα λογοκριμένα δεδομένα (π.χ. περιορισμένο χρονικό διάστημα παρατήρησης), την έλλειψη ανεξαρτησίας (π.χ. επιδράσεις γέννας και επαναλαμβανόμενες μετρήσεις) και τις άνισες διακυμάνσεις. Τα γενικευμένα γραμμικά μικτά μοντέλα και τα μοντέλα δόσης-απόκρισης καλύπτουν μια ευρεία κατηγορία αναλυτικών εργαλείων που ενδέχεται να είναι κατάλληλα για τα δεδομένα που προκύπτουν από την παρούσα μέθοδο δοκιμών. Η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει επαρκείς πληροφορίες για τη μέθοδο ανάλυσης και το χρησιμοποιηθέν πρόγραμμα υπολογιστή, ώστε ένας ανεξάρτητος αναθεωρητής/στατιστικολόγος να μπορεί να αξιολογήσει/επαναξιολογήσει την ανάλυση.

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

78. Τα ευρήματα θα πρέπει να αξιολογούνται όσον αφορά τις παρατηρούμενες επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων των ευρημάτων της νεκρωσίας και της μικροσκοπικής εξέτασης. Η αξιολόγηση περιλαμβάνει τη σχέση ή την απουσία σχέσης μεταξύ της δόσης και της παρουσίας ανωμαλιών, της συχνότητας εμφάνισής τους (επίπτωση) και της σοβαρότητάς τους, συμπεριλαμβανομένων των μακροσκοπικών αλλοιώσεων. Θα πρέπει να αξιολογούνται επίσης τα όργανα-στόχοι, η γονιμότητα, οι κλινικές ανωμαλίες, οι αναπαραγωγικές επιδόσεις και οι επιδόσεις της γέννας, οι μεταβολές του σωματικού βάρους, η θνησιμότητα και κάθε άλλη τοξική επίδραση ή επίδραση στην ανάπτυξη. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίδεται στις αλλαγές που παρατηρούνται μόνο στο ένα φύλο. Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της δοκιμής, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας και, όταν είναι διαθέσιμα, τα τοξικοκινητικά δεδομένα, συμπεριλαμβανομένων της μεταφοράς μέσω του πλακούντα και της απέκκρισης στο γάλα.

Έκθεση δοκιμής

79. Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τις ακόλουθες πληροφορίες, που προκύπτουν στην παρούσα μελέτη από τα ζώα P, F₁ και F₂ (κατά περίπτωση):

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

- όλες οι σχετικές διαθέσιμες πληροφορίες για τις χημικές, τοξικοκινητικές και τοξικοδυναμικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·
- στοιχεία ταυτότητας·
- καθαρότητα·

Φορέας (εάν χρησιμοποιείται):

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα, εάν δεν πρόκειται για νερό·

Πειραματόζωα:

- είδος/στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε·
- αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων·
- προέλευση, συνθήκες στέγασης, σιτηρέσιο, υλικά κατασκευής φωλιάς κ.λπ·
- βάρος κάθε ζώου κατά την έναρξη της δοκιμής·
- δεδομένα κολπικού επιχρίσματος για τα θηλυκά ζώα P πριν από την έναρξη της αγωγής (εάν συλλέγονται δεδομένα τη συγκεκριμένη στιγμή)·
- καταγεγραμμένα στοιχεία για τα ζεύγη των ζώων της γενεάς P, τα οποία αναφέρουν το αρσενικό και το θηλυκό ζώο που συμμετείχαν σε κάθε ζευγάρι και την επιτυχία της·
- καταγεγραμμένα στοιχεία για τη γέννα από την οποία προήλθαν τα ενήλικα ζώα της γενεάς F₁·

Συνθήκες δοκιμής:

- αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·
- λεπτομέρειες σχετικά με το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας/του σιτηρεσίου, τις επιτευχθείσες συγκεντρώσεις·
- σταθερότητα και ομοιογένεια του παρασκευάσματος στον φορέα (π.χ. στο σιτηρέσιο, στο πόσιμο νερό), στο αίμα και/ή στο γάλα υπό τις συνθήκες χρήσης και αποθήκευσης μεταξύ των χρήσεων·
- λεπτομέρειες σχετικά με τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·
- μετατροπή της συγκέντρωσης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/πόσιμο νερό (ppm) σε επιτευχθείσα δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), εφόσον έχει γίνει·
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού (μεταξύ άλλων, σύσταση του σιτηρεσίου, εάν είναι διαθέσιμη)·
- λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών τυχαιοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την επιλογή νεογνών προς απόρριψη και για την κατανομή νεογνών στις ομάδες δοκιμής·
- περιβαλλοντικές συνθήκες·
- κατάλογος του προσωπικού που συμμετείχε στη μελέτη, με αναφορά της επαγγελματικής του κατάρτισης·

Αποτελέσματα (συγκεφαλαιωτικά και ατομικά δεδομένα ανά φύλο και δόση):

- κατανάλωση τροφής, κατανάλωση νερού, εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, αποδοτικότητα της τροφής (αύξηση του σωματικού βάρους ανά γραμμάριο καταναλωθείσας τροφής, εκτός από τις περιόδους συμβίωσης και γαλουχίας) και κατανάλωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (σε περίπτωση χορήγησης μέσω της τροφής/του πόσιμου νερού) από τα ζώα P και F₁·
- δεδομένα απορρόφησης (εάν είναι διαθέσιμα)·
- δεδομένα για το σωματικό βάρος των ζώων P·
- δεδομένα για το σωματικό βάρος των επιλεγμένων ζώων F₁ μετά τον απογαλακτισμό·
- χρόνος θανάτου κατά τη διάρκεια της μελέτης ή επιβίωση έως τη λήξη της·
- είδος, σοβαρότητα και διάρκεια των κλινικών παρατηρήσεων (αναστρέψιμων ή μη)·
- αποτελέσματα αιματολογικών εξετάσεων, ανάλυσης ούρων και κλινικής χημικής ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των τιμών TSH και T4·
- φαινοτυπική ανάλυση των κυττάρων του σπλήνα (κύτταρα T, B, φυσικά φονικά κύτταρα)·
- κυτταρική του μυελού των οστών·
- δεδομένα τοξικής απόκρισης·
- αριθμός θηλυκών ζώων P και F₁ με κανονικό ή μη κανονικό οιστρικό κύκλο και διάρκεια του κύκλου·
- χρόνος έως ζευγάρισμα (χρονικό διάστημα πριν από τη συνουσία, αριθμός ημερών από τον σχηματισμό των ζευγών έως το ζευγάρισμα)·
- τοξικές ή άλλες επιδράσεις στην αναπαραγωγή, συμπεριλαμβανομένων αριθμών και ποσοστών ζώων που ολοκλήρωσαν το ζευγάρισμα, την κύηση, τον τοκετό και τη γαλουχία, αρσενικών ζώων που προκάλεσαν κύηση και θηλυκών ζώων που παρουσίασαν σημεία δυστοκίας/παρατεταμένου ή δύσκολου τοκετού·
- διάρκεια της κύησης και, εφόσον υπάρχουν δεδομένα, του τοκετού·
- αριθμός εμφυτεύσεων, μέγεθος γέννας και ποσοστό αρσενικών νεογνών·

- αριθμός και ποσοστό απωλειών εμβρύων μετά την εμφύτευση, ζώων που γεννήθηκαν ζωντανά και ζώων που γεννήθηκαν νεκρά·
- δεδομένα για το βάρος της γέννας και των νεογνών (αρσενικών, θηλυκών και συνδυαστικά δεδομένα), αριθμός καχεκτικών ζώων, εάν έχει προσδιοριστεί·
- αριθμός νεογνών με μακροσκοπικά ορατές ανωμαλίες·
- τοξικές ή άλλες επιδράσεις στους απογόνους, στη μεταγεννητική ανάπτυξη, στη βιωσιμότητα κ.λπ·
- δεδομένα για σωματικά ορόσημα στα νεογνά και άλλα δεδομένα μεταγεννητικής ανάπτυξης·
- δεδομένα για τη σεξουαλική ωρίμαση των ζώων F_1 ·
- δεδομένα για τις παρατηρήσεις λειτουργιών σε νεογνά και ενήλικα ζώα, κατά περίπτωση·
- σωματικό βάρος κατά τη θανάτωση και δεδομένα απόλυτου και σχετικού βάρους οργάνων για τα ζώα P και τα ενήλικα ζώα F_1 ·
- ευρήματα της νεκροψίας·
- λεπτομερής περιγραφή όλων των ιστοπαθολογικών ευρημάτων·
- συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ουράς επιδιδυμίδας, ποσοστό προοδευτικά κινούμενων σπερματοζωαρίων, ποσοστό μορφολογικά φυσιολογικών σπερματοζωαρίων και ποσοστό σπερματοζωαρίων με κάθε προσδιοριζόμενη ανωμαλία για τα αρσενικά ζώα P και F_1 ·
- αριθμοί και στάδια ωρίμασης των ωοθυλακίων που υπήρχαν στις ωοθήκες των θηλυκών ζώων P και F_1 , κατά περίπτωση·
- καταμέτρηση των ωχρών σωματίων στις ωοθήκες των θηλυκών ζώων F_1 ·
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπου ενδείκνυται.

Παράμετροι της 2ης κοόρτης:

- λεπτομερής περιγραφή των διαδικασιών που χρησιμοποιήθηκαν για την τυποποίηση των παρατηρήσεων και των διαδικασιών, καθώς και λειτουργικοί ορισμοί για τη βαθμολόγηση των παρατηρήσεων·
- κατάλογος όλων των διαδικασιών δοκιμής που χρησιμοποιήθηκαν και αιτιολόγηση της χρήσης τους·
- λεπτομέρειες για τις συμπεριφορικές/λειτουργικές, νευροπαθολογικές και μορφομετρικές διαδικασίες που χρησιμοποιήθηκαν, με πληροφορίες και λεπτομέρειες για τις αυτόματες συσκευές·
- διαδικασίες βαθμονόμησης και εξασφάλισης της ισοδυναμίας των συσκευών και της εξισορρόπησης των ομάδων αγωγής στις διαδικασίες δοκιμής·
- συνοπτική επεξήγηση των αποφάσεων που περιλαμβάνουν επαγγελματική κρίση·
- λεπτομερής περιγραφή όλων των συμπεριφορικών/λειτουργικών, νευροπαθολογικών και μορφομετρικών ευρημάτων ανά φύλο και ομάδα δόσης, συμπεριλαμβανομένων των αυξήσεων και μειώσεων σε σχέση με τις ομάδες μαρτύρων·
- βάρος εγκεφάλου·
- διαγνώσεις με βάση νευρολογικά σημεία και αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένων των φυσικώς απαντόμενων ασθενειών ή παθολογικών καταστάσεων·
- εικόνες αντιπροσωπευτικών ευρημάτων·
- εικόνες χαμηλής ισχύος για την εκτίμηση της ομολογίας των τομών που χρησιμοποιήθηκαν για μορφομετρία·
- στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένων των στατιστικών μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων, και αποτελέσματα, ανεξαρτήτως του αν είναι σημαντικά ή όχι·
- συνεκτίμηση τυχόν άλλων τοξικών επιδράσεων για τη συναγωγή συμπεράσματος σχετικά με το νευροτοξικό δυναμικό της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, ανά φύλο και ομάδα δόσης·
- επιπτώσεις τοξικοκινητικών πληροφοριών στα συμπεράσματα·
- δεδομένα που τεκμηριώνουν την αξιοπιστία και την ευαισθησία της μεθόδου δοκιμών (π.χ. δεδομένα για θετικούς μάρτυρες και ιστορικούς μάρτυρες)·
- σχέσεις, εάν υπάρχουν, μεταξύ των νευροπαθολογικών και των λειτουργικών επιδράσεων·
- NOAEL ή δόση αναφοράς για μητέρες και απογόνους, ανά φύλο και ομάδα δόσης·
- συζήτηση της συνολικής ερμηνείας των δεδομένων βάσει των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένου συμπεράσματος για το αν η χημική ουσία προκάλεσε αναπτυξιακή νευροτοξικότητα ή όχι και του NOAEL.

Παράμετροι της 3ης κοόρτης:

- τίτλοι αντισώματος IgM στον ορό (ευαισθητοποίηση στα SRCM ή στην KLH) ή μονάδες PFC IgM στον σπλήνα (ευαισθητοποίηση στα SRCM)·
- η εφαρμογή της μεθόδου TDAR θα πρέπει να επιβεβαιώνεται, στο πλαίσιο της διαδικασίας βελτιστοποίησης από τα εργαστήρια που οργανώνουν τον προσδιορισμό για πρώτη φορά και περιοδικά (π.χ. ετησίως) από όλα τα εργαστήρια·
- συζήτηση της συνολικής ερμηνείας των δεδομένων βάσει των αποτελεσμάτων, συμπεριλαμβανομένου συμπεράσματος για το αν η χημική ουσία προκάλεσε αναπτυξιακή ανοσοτοξικότητα ή όχι και του NOAEL·

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπεράσματα, συμπεριλαμβανομένων τιμών NOAEL για τις επιδράσεις στα γονικά ζώα και στους απογόνους.

Θα πρέπει να παρέχεται επίσης κάθε πληροφορία που δεν προέκυψε κατά τη μελέτη αλλά είναι χρήσιμη για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (π.χ. ομοιότητες των επιδράσεων με εκείνες γνωστών νευροτοξικών ουσιών).

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

80. Η εκτεταμένη μελέτη τοξικότητας στην αναπαραγωγή μίας γενεάς παρέχει πληροφορίες για τις επιδράσεις της επανειλημμένης έκθεσης σε μια χημική ουσία κατά τη διάρκεια όλων των φάσεων του αναπαραγωγικού κύκλου, ανάλογα με τις ανάγκες. Ειδικότερα, η μελέτη παρέχει πληροφορίες για το αναπαραγωγικό σύστημα και για τελικά σημεία ανάπτυξης, αύξησης, επιβίωσης και λειτουργιών των απογόνων έως την 90ή ΜΓΗ.
81. Στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μελέτης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες για τη χημική ουσία, συμπεριλαμβανομένων των φυσικοχημικών, τοξικοκινητικών και τοξικοδυναμικών ιδιοτήτων της, οι διαθέσιμες πληροφορίες για ουσίες ανάλογης δομής και τα αποτελέσματα μελετών τοξικότητας που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν με την ελεγχόμενη χημική ουσία (π.χ. μελέτες οξείας τοξικότητας, τοξικότητας μετά από επανειλημμένη εφαρμογή, μελέτες μηχανισμών και μελέτες με τις οποίες αξιολογείται αν υπάρχουν σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των ειδών όσον αφορά τις μεταβολικές ιδιότητες *in vivo/in vitro*). Εφόσον είναι εφικτό, τα αποτελέσματα της νεκροψίας-νεκροτομής και της ζύγισης των οργάνων θα πρέπει να αξιολογούνται σε συνάρτηση με τις παρατηρήσεις από άλλες μελέτες με επαναλαμβανόμενη δόση. Οι μειώσεις στην ανάπτυξη των απογόνων μπορούν να εξετάζονται σε σχέση με την επίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη σύσταση του γάλακτος (29).

Κοόρτη 2 (αναπτυξιακή νευροτοξικότητα)

82. Τα νευροσυμπεριφορικά και νευροπαθολογικά αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται σε συνάρτηση με όλα τα ευρήματα, με τη χρήση προσέγγισης που βασίζεται στο βάρος της μαρτυρίας, σε συνδυασμό με την κρίση των ειδικών. Θα πρέπει να συζητούνται τα πρότυπα των σχετικών με τη συμπεριφορά ή τη μορφολογία ευρημάτων, εφόσον υπάρχουν, καθώς και οι ενδείξεις σχέσης δόσης-απόκρισης. Ο χαρακτηρισμός αυτός θα πρέπει να περιλαμβάνει αξιολόγηση της αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, συμπεριλαμβανομένων επιδημιολογικών μελετών ή εκθέσεων περιστατικών σε ανθρώπους και πειραματικών μελετών σε ζώα (π.χ. τοξικοκινητικά δεδομένα, πληροφορίες για τη σχέση δομής-δράσης, δεδομένα από άλλες μελέτες τοξικότητας). Η αξιολόγηση των δεδομένων θα πρέπει να περιλαμβάνει συζήτηση τόσο της βιολογικής όσο και της στατιστικής σημαντικότητας, καθώς και τη σχέση, εάν υπάρχει, μεταξύ των παρατηρούμενων νευροπαθολογικών αλλοιώσεων και αλλαγών στη συμπεριφορά. Για καθοδήγηση σχετικά με την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αναπτυξιακής νευροτοξικότητας, βλ. μέθοδο δοκιμών B.53 (35) και Tyl et al., 2008 (31).

Κοόρτη 3 (αναπτυξιακή ανοσοτοξικότητα)

83. Η καταστολή ή η ενίσχυση της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως εκτιμάται μέσω της TDAR (εξαρτώμενη από κύτταρα Τ απόκριση αντισωμάτων), θα πρέπει να αξιολογείται σε συνάρτηση με όλες τις παρατηρήσεις. Η σημαντικότητα του αποτελέσματος της TDAR μπορεί να τεκμηριώνεται και από άλλες επιδράσεις σε ανοσολογικά σχετικούς δείκτες (π.χ. κυτταρικότητα του μυελού των οστών, βάρος και ιστοπαθολογία των λεμφικών ιστών, κατανομή υποσυνόλων των λεμφοκυττάρων). Οι επιδράσεις που διαπιστώνονται μέσω της TDAR ενδέχεται να μην είναι τόσο σημαντικές στην περίπτωση που παρατηρούνται άλλες τοξικές επιδράσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις έκθεσης.
84. Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων που αφορούν την αναπαραγωγή και τη νευροτοξικότητα θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως βοήθημα το καθοδηγητικό έγγραφο αριθ. 43 του ΟΟΣΑ (26).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

- (2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), "Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets", *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- (3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- (4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), "Direct Dosing of Prewaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group", *International Journal of Toxicology*, 24, 87-94.
- (5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), "Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment", *Toxicological Sciences*, 49, 1-4.
- (6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), "Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey", *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293-327.
- (7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), "Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356-369.
- (8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). "Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies", *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1-21.
- (9) Creasy, D.M. (2003), "Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology", *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408-415.
- (10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), "The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies", *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84-97.
- (11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), "Cycles and Seasons", in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- (12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), "Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights", *Reproductive Toxicology*, 13: 383-390.
- (13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), "Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat", *Biological Reproduction*, 17, 298-303.
- (14) Ladics, G.S. (2007), "Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing", *Methods*, 41, 9-19.
- (15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), "Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation", *Toxicology*, 197, 23-35.
- (16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), "A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat", *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92-108.
- (17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), "Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats", *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103-107.
- (18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), "The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat". *Reproductive Toxicology*, 5, 39-44.
- (19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), "Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report", *Reproductive Toxicology*, 10, 237- 244.
- (20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), "Methods for Assessing Rat Sperm Motility", *Reproductive Toxicology*, 6, 267-273.
- (21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), "Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration", *Journal of Andrology*, 13, 409-421.

- (22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), "Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations", *Reproductive Toxicology*, 5, 449-458.
 - (23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), "Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer", *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
 - (24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), "The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations", *Journal of Andrology*, 10, 401-415.
 - (25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), "Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants", *Reproductive Toxicology*, 6, 491-505.
 - (26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
 - (27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), "Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility", *Journal of Andrology*, 8, 330-337.
 - (28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), "A 'Best Practices' Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today", *Toxicological Pathology*, 34, 296-313.
 - (29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), "Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components", *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8-16.
 - (30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), "Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats", *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
 - (31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), "Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints", *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349-381.
 - (32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
 - (33) Κεφάλαιο Β.43 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη νευροτοξικότητας σε τρωκτικά.
 - (34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
 - (35) Κεφάλαιο Β.53 του παρόντος παραρτήματος: Μελέτη αναπτυξιακής νευροτοξικότητας
 - (36) Κεφάλαιο Β.54 του παρόντος παραρτήματος: Μητροτροφικός βιοπροσδιορισμός σε τρωκτικά: Βραχυπρόθεσμη δοκιμή διαλογής για οιστρογονικές ιδιότητες
 - (37) Κεφάλαιο Β.55 του παρόντος παραρτήματος: Βιοπροσδιορισμός Hershberger σε επίμους: Βραχυπρόθεσμος προσδιορισμός διαλογής για (αντι)ανδρογονικές ιδιότητες
 - (38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents*, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
 - (39) OECD (2011), *Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada*, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
 - (40) OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study*, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.
-

Προσάρτημα 1

Μετρήσεις και παρατηρήσεις που περιλαμβάνονται στη δέση παρατηρήσεων λειτουργιών (κόδρη 2Α)

Κλωβός στέγασης & ανοικτός χώρος	Χειραγώγηση	Φυσιολογία
Στάση του σώματος	Ευκολία απομάκρυνσης	Θερμοκρασία
Ακούσιες κλονικές και τονικές συσπάσεις	Ευκολία μεταχείρισης	Σωματικό βάρος
Κλείσιμο των βλεφάρων	Μυϊκός τόνος	Αντίδραση της κόρης του οφθαλμού
Ανόρθωση των τριχών	Αντίδραση σε προσέγγιση	Μέγεθος της κόρης του οφθαλμού
Σιελόρροια	Αντίδραση σε άγγιγμα	
Δακρύρροια	Αντίδραση σε ηχητικό ερέθισμα	
Φώνηση	Αντίδραση σε τσίμπημα της ουράς	
Οπισθοβάδιση	Αντίδραση ανόρθωσης (διορθωτικό αντανακλαστικό)	
Ανωμαλίες βάδισης	Διάσταση του άκρου που χρησιμοποιείται για το πάτημα	
Διέγερση	Ισχύς λαβής πρόσθιων άκρων	
Στερεότυπες κινήσεις	Ισχύς λαβής οπίσθιων άκρων	
Περίεργη συμπεριφορά		
Κηλίδες		
Ανωμαλίες αναπνοής		

Προσάρτημα 2

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: Κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

B.57. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗΣ H295R

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

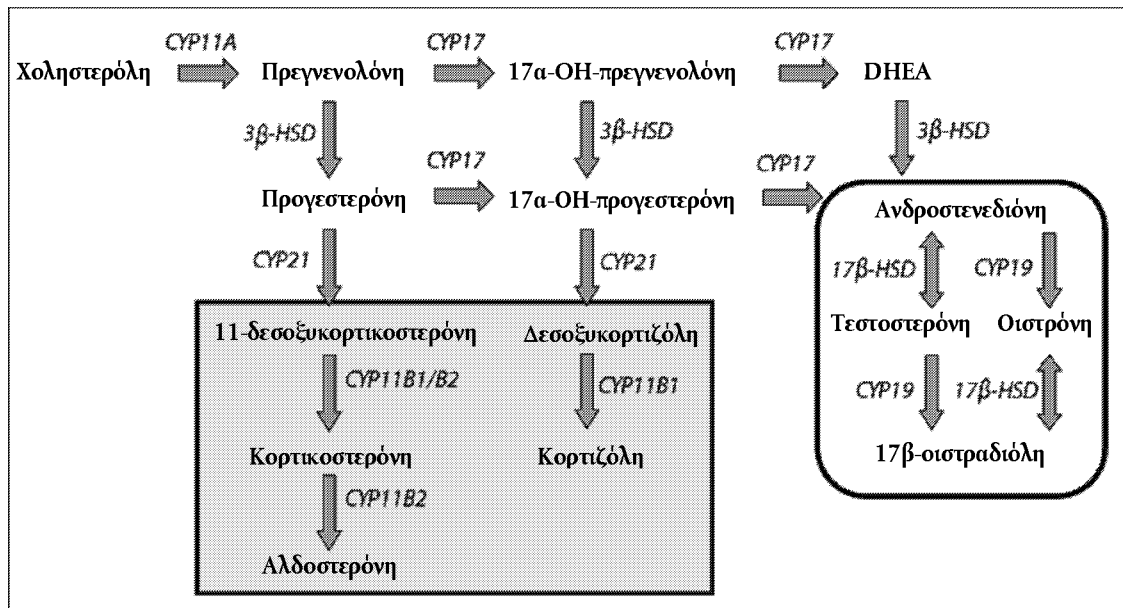
1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 456 (2011). Το 1998 ο ΟΟΣΑ ανέλαβε μια δραστηριότητα πρώτης προτεραιότητας με σκοπό την αναθεώρηση των υφιστάμενων και την εκπόνηση νέων κατευθυντήριων γραμμών δοκιμών για τη διαλογή και τις δοκιμές δυνητικών ενδοκρινικών διαταρακτών. Το εννοιολογικό πλαίσιο του ΟΟΣΑ, του 2002, για τις δοκιμές και την αξιολόγηση χημικών ενδοκρινικών διαταρακτών περιλαμβάνει πέντε επίπεδα, καθένα από τα οποία αντιστοιχεί σε διαφορετικό επίπεδο βιολογικής πολυπλοκότητας (1). Ο προσδιορισμός στεροειδογένεσης H295R *in vitro* (H295R), που περιγράφεται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών, χρησιμοποιεί μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά από επινεφριδικό καρκίνωμα (κύτταρα NCI-H295R) και αποτελεί 2ου επιπέδου “προσδιορισμό *in vitro* για την παροχή μηχανιστικών δεδομένων”, προοριζόμενο να χρησιμοποιείται για διαλογή και ιεράρχηση. Ο προσδιορισμός αναπτύχθηκε και τυποποιήθηκε ως μέθοδος διαλογής για τις επιδράσεις των χημικών ουσιών στη στεροειδογένεση, ιδίως στην παραγωγή της 17β-οιστραδιόλης (E2) και της τεστοστερόνης (T), στο πλαίσιο πολυσταδιακής διαδικασίας. Ο προσδιορισμός H295R έχει βελτιστοποιηθεί και επικυρωθεί (2) (3) (4) (5).
2. Στόχος του προσδιορισμού στεροειδογένεσης H295R είναι η ανίχνευση χημικών ουσιών που επηρεάζουν την παραγωγή της E2 και της T. Ο εν λόγω προσδιορισμός προορίζεται να χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ξενοβιοτικών ουσιών που στοχεύουν στα ενδογενή στοιχεία της ενδοκυτταρικής βιοχημικής πορείας που αρχίζει με την αλληλουχία αντιδράσεων από τη χοληστερόλη έως την παραγωγή της E2 και/ή της T. Σκοπός του προσδιορισμού H295R δεν είναι η ταυτοποίηση χημικών ουσιών που επηρεάζουν τη στεροειδογένεση λόγω επιδράσεων στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG). Με τον προσδιορισμό αυτό επιδιώκεται μια θετική ή αρνητική απάντηση σχετικά με τη δυνατότητα μιας χημικής ουσίας να επάγει ή να αναστέλλει την παραγωγή της T και της E2. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να ληφθούν ποσοτικά αποτελέσματα (βλ. παραγράφους 53 και 54). Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού εκφράζονται ως σχετικές αλλαγές στην παραγωγή ορμονών σε σύγκριση με μάρτυρες με τον διαλύτη (ΜΔ). Ο προσδιορισμός δεν στοχεύει στην παροχή συγκεκριμένων μηχανιστικών πληροφοριών σχετικά με την αλληλεπίδραση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας με το ενδοκρινικό σύστημα. Έχει διεξαχθεί έρευνα με χρήση της κυτταρικής σειράς για τον προσδιορισμό των επιδράσεων σε συγκεκριμένα ένζυμα και ενδιάμεσες ορμόνες, όπως η προγεστερόνη (2).
3. Οι ορισμοί και οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα μέθοδο δοκιμών παρατίθενται στο προσάρτημα. Λεπτομερές πρωτόκολλο με οδηγίες για τον τρόπο παρασκευής των διαλυμάτων, καλλιέργειας των κυττάρων και εκτέλεσης των διαφόρων πτυχών της δοκιμής είναι διαθέσιμο ως προσάρτημα I-III του εγγράφου “Πολυεργαστηριακή επικύρωση του προσδιορισμού στεροειδογένεσης H295R για την ταυτοποίηση ρυθμιστών της παραγωγής τεστοστερόνης και οιστραδιόλης” του ΟΟΣΑ (4).

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

4. Στη βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών του φύλου συμμετέχουν πέντε διαφορετικά ένζυμα που καταλούν έξι διαφορετικές αντιδράσεις. Η ενζυμική μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη, η οποία καταλύεται από το ένζυμο διάσπασης της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης (CYP11A), που ανήκει στην οικογένεια ενζύμων κυτόχρωμα P450 (CYP), είναι το πρώτο βήμα σε μια σειρά βιοχημικών αντιδράσεων που κορυφώνονται με τη σύνθεση τελικών στεροειδών. Ανάλογα με τη σειρά των επόμενων δύο αντιδράσεων, η πορεία στεροειδογένεσης χωρίζεται σε δύο κλάδους, τη Δ⁵-υδροξυστεροειδική και τη Δ⁴-κετοστεροειδική πορεία, οι οποίες συγκλίνουν στην παραγωγή ανδροστενεδιόνης (σχήμα 1).
5. Η ανδροστενεδιόνη μετατρέπεται σε τεστοστερόνη (T) από τη 17β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση (17β-HSD). Η τεστοστερόνη είναι ταυτόχρονα ενδιάμεση και τελική ορμόνη. Στα αρσενικά ζώα, μπορεί να μετατραπεί σε διυδροτεστοστερόνη (DHT) από την 5α-ρεδοουκτάση, η οποία απαντά στις κυτταρικές μεμβράνες, στον πυρηνικό φάκελο και στο ενδοπλασματικό δίκτυο των ιστών-στόχων ανδρογονικής δράσης, όπως ο προστάτης και οι σπερματοδόχοι κύστες. Η DHT είναι σημαντικά ισχυρότερο ανδρογόνο από την T και θεωρείται επίσης τελική ορμόνη· δεν μετράται με τον προσδιορισμό H295R (βλ. παράγραφο 10).
6. Το ένζυμο της πορείας στεροειδογένεσης που μετατρέπει ανδρογόνες χημικές ουσίες σε οιστρογόνες είναι η αρωματάση (CYP19). Η CYP19 μετατρέπει την T σε 17β-οιστραδιόλη (E2) και την ανδροστενεδιόνη σε οιστρόνη. Η E2 και η T θεωρούνται τελικές ορμόνες της πορείας στεροειδογένεσης.
7. Η ειδικότητα της δράσης λυάσης του CYP17 διαφέρει μεταξύ των ειδών ως προς τα ενδιάμεσα υποστρώματα. Στον άνθρωπο, το ένζυμο ευνοεί υποστρώματα της Δ⁵-υδροξυστεροειδικής πορείας (πρεγνενολόνη), ενώ τα υποστρώματα της Δ⁴-κετοστεροειδικής πορείας (προγεστερόνη) ευνοούνται στον επίμυ (19). Αυτές οι διαφορές στη δράση λυάσης του CYP17 ενδέχεται να εξηγούν ορισμένες ειδοεξαρτώμενες διαφορές στην απόκριση σε χημικές ουσίες που μεταβάλλουν τη στεροειδογένεση *in vivo*(6). Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα H295 αντανακλούν με τη μέγιστη προσέγγιση την έκφραση των ενζύμων των επινεφριδίων και την παραγωγή στεροειδών σε ενήλικους ανθρώπους (20), αλλά είναι γνωστό ότι εκφράζονται στα εν λόγω κύτταρα ένζυμα τόσο της Δ⁵-υδροξυστεροειδικής όσο και της Δ⁴-κετοστεροειδικής πορείας σύνθεσης ανδρογόνων (7) (11) (13) (15).

Σχήμα 1

Πορεία της στεροειδογένεσης σε κύτταρα H295R



Σημείωση:

Τα ένζυμα εμφανίζονται με πλάγιους χαρακτήρες και οι ορμόνες με έντονους χαρακτήρες, ενώ τα βέλη δείχνουν την κατεύθυνση της σύνθεσης. Το γκρι φόντο δηλώνει πορείες/προϊόντα κορτικοστεροειδών. Οι πορείες/τα προϊόντα στεροειδών του φύλου εμφανίζονται εντός κύκλου. CYP = κυτόχρωμα P450, HSD = υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση, DHEA = αφυδροεπιανδροστερόνη.

8. Η ανθρώπινη κυτταρική σειρά H295R από επινεφριδικό καρκίνωμα αποτελεί χρήσιμο μοντέλο *in vitro* για τη διερεύνηση των επιδράσεων στη σύνθεση των στεροειδών ορμονών (2) (7) (8) (9) (10). Στην κυτταρική σειρά H295R εκφράζονται γονίδια που κωδικοποιούν όλα τα κείριας σημασίας για τη στεροειδογένεση· ένζυμα που αναφέρονται ανωτέρω (11) (15) (σχήμα 1). Πρόκειται για μοναδική ιδιότητα, διότι η έκφραση αυτών των γονιδίων *in vivo* είναι εξειδικευμένη ανά ιστό και στάδιο της ανάπτυξης και, συνήθως, σε κανέναν ιστό και σε κανένα στάδιο ανάπτυξης δεν εκφράζονται όλα τα γονίδια που συμμετέχουν στη στεροειδογένεση (2). Τα κύτταρα H295R έχουν τα χαρακτηριστικά φυσιολογίας των ζωνικά αδιαφοροποιητών κυττάρων των επινεφριδίων των ανθρώπινων εμβρύων (11). Αποτελούν ένα μοναδικό σύστημα *in vitro*, καθώς έχουν την ικανότητα να παράγουν όλες τις στεροειδείς ορμόνες που απαντούν στον φλοιό των επινεφριδίων και στις γονάδες των ενηλίκων, επιτρέποντας τον έλεγχο επιδράσεων τόσο στη σύνθεση των κορτικοστεροειδών όσο και στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών του φύλου, όπως τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα, παρ' όλο που ο προσδιορισμός έχει επικυρωθεί μόνο για την ανίχνευση T και E2. Οι αλλαγές που καταγράφονται από το σύστημα δοκιμής με τη μορφή της μεταβολής της παραγωγής T και E2 μπορεί να είναι αποτέλεσμα πλήθους διαφορετικών αλληλεπιδράσεων των ελεγχόμενων χημικών ουσιών με στεροειδογόνες λειτουργίες που εκφράζονται από τα κύτταρα H295R. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγεται η ρύθμιση της έκφρασης, της σύνθεσης ή της λειτουργίας των ενζύμων που συμμετέχουν στην παραγωγή, τον μετασχηματισμό ή την απομάκρυνση των στεροειδών ορμονών (12) (13) (14). Η αναστολή της παραγωγής ορμονών μπορεί να οφείλεται σε άμεση ανταγωνιστική σύνδεση με ένζυμο της πορείας, σε επιπτώσεις σε συμπαράγοντες, όπως το NADPH (φωσφορικό νικοτιναμίδο-αδενοδινουκλεοτίδιο) και το cAMP (κυκλικό αδενοσινομονοφωσφορικό οξύ), και/ή σε αύξηση του μεταβολισμού των στεροειδών ή καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ορισμένων ενζύμων της πορείας στεροειδογένεσης. Ενώ η αναστολή μπορεί να είναι συνάρτηση τόσο άμεσων όσο και έμμεσων διεργασιών που συνδέονται με την παραγωγή ορμονών, η επαγωγή είναι συνήθως έμμεσου χαρακτήρα, π.χ. με την επίδραση σε συμπαράγοντες όπως το NADPH και το cAMP (όπως στην περίπτωση της φορσοκλίνης), τη μείωση του μεταβολισμού των στεροειδών (13) και/ή την ενισχυτική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων στεροειδογένεσης.

9. Ο προσδιορισμός H295R παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα:

- επιτρέπει την ανίχνευση αυξήσεων και μειώσεων της παραγωγής T και E2·
- επιτρέπει την άμεση εκτίμηση των δυνητικών επιπτώσεων μιας χημικής ουσίας στη βιωσιμότητα των κυττάρων/κυτταροτοξικότητα. Αυτό είναι σημαντικό χαρακτηριστικό, καθώς παρέχει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ των επιδράσεων που οφείλονται στην κυτταροτοξικότητα και εκείνων που οφείλονται στην άμεση αλληλεπίδραση των χημικών ουσιών με τις στεροειδογενετικές πορείες, η οποία δεν είναι δυνατή σε συστήματα καλλιέργειας ιστοτεμαχίων που αποτελούνται από κύτταρα πολλών τύπων με διαφορετικούς βαθμούς ευαισθησίας και διαφορετικές λειτουργίες·

- δεν απαιτεί τη χρήση ζώων·
 - η κυτταρική σειρά H295R είναι διαθέσιμη στο εμπόριο.
10. Οι κύριοι περιορισμοί του προσδιορισμού είναι οι εξής:
- Η μεταβολική του ικανότητα είναι άγνωστη και πιθανώς αρκετά περιορισμένη. Επομένως, με τον παρόντα προσδιορισμό είναι πιθανόν να μην εντοπιστούν χημικές ουσίες που πρέπει να ενεργοποιηθούν μέσω του μεταβολισμού.
 - Δεδομένου ότι προέρχεται από επινεφριδικό ιστό, η κυτταρική σειρά H295R, διαθέτει τα ένζυμα που μπορούν να παράγουν γλυκοκορτικοειδή και μεταλλοκορτικοειδή, καθώς και τις ορμόνες του φύλου. Επομένως, οι επιδράσεις στην παραγωγή γλυκοκορτικοειδών και μεταλλοκορτικοειδών ενδέχεται να επηρεάζουν τα επίπεδα T και E2 που παρατηρούνται στον προσδιορισμό.
 - Με τον προσδιορισμό δεν μετράται η DHT και, συνεπώς, δεν αναμένεται να ανιχνεύονται χημικές ουσίες που αναστέλλουν την 5α-ρεδουκτάση. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο προσδιορισμός Hersherberger (16).
 - Με τον προσδιορισμό H295R δεν ανιχνεύονται χημικές ουσίες που παρεμποδίζουν τη στεροειδογένεση επιδρώντας στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων (HPG), καθώς η επίδραση αυτή μπορεί να μελετηθεί μόνο σε άδικτα ζώα.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Σκοπός του προσδιορισμού είναι η ανίχνευση χημικών ουσιών που επηρεάζουν την παραγωγή T και E2. Η T είναι επίσης ενδιάμεση ορμόνη στην πορεία παραγωγής της E2. Με τον προσδιορισμό είναι δυνατόν να ανιχνευθούν χημικές ουσίες που συνήθως αναστέλλουν ή επάγουν τα ένζυμα της πορείας στεροειδογένεσης.
12. Ο προσδιορισμός εκτελείται συνήθως υπό τυπικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας σε πλάκες καλλιέργειας των 24 κοιλότητων (φρεατίων). Εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλάκες άλλου μεγέθους για τη διεξαγωγή του προσδιορισμού. Ωστόσο, ο εμβολιασμός των πλακών και οι πειραματικές συνθήκες θα πρέπει να προσαρμόζονται αναλόγως ώστε να εξασφαλίζεται η συμμόρφωση με τα κριτήρια επιδόσεων.
13. Μετά από 24ωρη περίοδο εγκλιματισμού σε πλάκες πολλών κοιλότητων, τα κύτταρα εκτίθενται για 48 ώρες σε επτά συγκεντρώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, τουλάχιστον εις τριπλούν. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται διαλυτής, και ως θετικός μάρτυρας ένας γνωστός αναστολέας και ένας γνωστός επαγωγέας της παραγωγής ορμονών σε σταθερή συγκέντρωση. Στο τέλος της περιόδου έκθεσης, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο από κάθε κοιλότητα. Αμέσως μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου αναλύεται η βιωσιμότητα των κυττάρων σε κάθε κοιλότητα. Οι συγκεντρώσεις ορμονών στο θρεπτικό μέσο μπορούν να μετρηθούν με τη χρήση διαφόρων μεθόδων, μεταξύ άλλων με τα διαθέσιμα στο εμπόριο σύνολα αντιδραστηρίων (κιτ) ορμονικού προσδιορισμού και/ή με ενόργανες τεχνικές, όπως η υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS). Τα δεδομένα εκφράζονται ως πολλαπλασιαστική μεταβολή σε σύγκριση με τον μάρτυρα με τον διαλυτή και ως ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις (LOEC). Εάν ο προσδιορισμός είναι αρνητικός, η υψηλότερη συγκέντρωση που έχει ελεγχθεί αναφέρεται ως συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις (NOEC). Τα συμπεράσματα σχετικά με την ικανότητα μιας χημικής ουσίας να επηρεάζει τη στεροειδογένεση θα πρέπει να βασίζονται σε τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις της δοκιμής. Η πρώτη εκτέλεση μπορεί να χρησιμεύσει ως μέτρηση καθορισμού εύρους, ακολουθούμενη από ρύθμιση των συγκεντρώσεων για τη δεύτερη και την τρίτη εκτέλεση της δοκιμής, κατά περίπτωση, εάν ανακύψουν προβλήματα διαλυτότητας ή κυτταροτοξικότητας ή εάν η δραστηριότητα της χημικής ουσίας μοιάζει να βρίσκεται στο άκρο της κλίμακας συγκεντρώσεων που ελέγχθηκε.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Κυτταρική σειρά

14. Τα κύτταρα NCI-H295R είναι διαθέσιμα στο εμπόριο από τον οργανισμό American Type Culture Collections (ATCC) κατόπιν υπογραφής συμφωνίας για μεταβίβαση υλικού (Material Transfer Agreement/MTA) ⁽¹⁾.

Εισαγωγή

15. Λόγω του ότι η ικανότητα των κυττάρων να παράγουν E2 μεταβάλλεται με την πρόοδο της ηλικίας/τις ανακαλλιέργειες (2), τα κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται σύμφωνα με ειδικό πρωτόκολλο πριν χρησιμοποιηθούν και να σημειώνονται το πλήθος των ανακαλλιεργειών μετά την απόψυξη των κυττάρων, καθώς και ο αριθμός ανακαλλιέργειας κατά την κατάψυξη και την αποθήκευση των κυττάρων σε υγρό άζωτο. Ο πρώτος αριθμός δηλώνει τον πραγματικό αριθμό ανακαλλιεργειών των κυττάρων, ενώ ο δεύτερος τον αριθμό της ανακαλλιέργειας από την οποία καταψύχθηκαν και φυλάχθηκαν τα κύτταρα. Παραδείγματος χάριν, κύτταρα που είχαν καταψυχθεί μετά την πέμπτη ανακαλλιέργεια, αποψύχθηκαν και, στη συνέχεια, διαψύχθηκαν τρεις φορές (4 ανακαλλιέργειες, όπου ως ανακαλλιέργεια 1 θεωρούνται τα αποψυχόμενα κύτταρα), μετά την εκ νέου καλλιέργειά τους φέρουν την ετικέτα "ανακαλλιέργεια 4.5". Παράδειγμα συστήματος αρίθμησης παρουσιάζεται στο προσάρτημα I της έκθεσης επικύρωσης (4).
16. Χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης ως βάση για το εμπλουτισμένο μέσο και το μέσο κατάψυξης. Το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο αποτελεί απαραίτητο συστατικό των κυτταροκαλλιεργειών. Το μέσο κατάψυξης είναι ειδικά

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

σχεδιασμένο ώστε να επιτρέπει την κατάψυξη κυττάρων για μακροπρόθεσμη φύλαξη χωρίς επιπτώσεις. Ο όρος Nu-serum (ή συγκρίσιμος όρος με τις ίδιες ιδιότητες, που έχει αποδειχθεί ότι παράγει δεδομένα που πληρούν τις απαιτήσεις επιδόσεων της δοκιμής και ποιοτικού ελέγχου), ο οποίος αποτελεί συστατικό των εμπλουτισμένων θρεπτικών μέσων, θα πρέπει να αναλύεται πριν χρησιμοποιηθεί, ώστε να προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις υποβάθρου T και E2. Η παρασκευή των διαλυμάτων αυτών περιγράφεται στο προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4).

17. Μετά την έναρξη καλλιέργειας κυττάρων H295R από μια αρχική παρτίδα του ATCC, τα κύτταρα θα πρέπει να αναπτύσσονται επί πέντε ανακαλλιέργειες (δηλ. να διαιρούνται 4 φορές). Στη συνέχεια, κύτταρα της πέμπτης ανακαλλιέργειας καταψύχονται σε υγρό άζωτο για φύλαξη. Πριν από την κατάψυξή τους, δείγμα κυττάρων της προηγούμενης, τέταρτης ανακαλλιέργειας υποβάλλεται σε δοκιμή σε πλάκα ποιοτικού ελέγχου (βλ. παραγράφους 36 και 37) για να ελεγχθεί αν η βασική παραγωγή ορμονών και η απόκριση στις χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως θετικοί μάρτυρες πληρούν τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου του προσδιορισμού που ορίζονται στον πίνακα 5.
18. Τα κύτταρα H295R θα πρέπει να καλλιεργούνται, να καταψύχονται και να φυλάσσονται σε υγρό άζωτο για να διασφαλίζεται ότι υπάρχουν μονίμως κύτταρα της κατάλληλης ανακαλλιέργειας/ηλικίας για καλλιέργεια και χρήση. Ο μέγιστος αριθμός ανακαλλιεργειών μετά την καλλιέργεια νέας ⁽¹⁾ ή κατεψυγμένης ⁽²⁾ παρτίδας κυττάρων που είναι αποδεκτός στον προσδιορισμό H295R δεν υπερβαίνει το 10. Παραδείγματος χάριν, οι αποδεκτοί αριθμοί ανακαλλιεργειών κυττάρων από μια παρτίδα που καταψύχθηκε μετά την 5η ανακαλλιέργεια κυμαίνονται από 4.5 έως 10.5. Στην περίπτωση των κυττάρων που προέρχονται από αυτές τις κατεψυγμένες παρτίδες, θα πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 19. Τα εν λόγω κύτταρα θα πρέπει να καλλιεργούνται τουλάχιστον τέσσερις (4) φορές ακόμη (ανακαλλιέργεια 4.5) πριν χρησιμοποιηθούν στη δοκιμή.

Εκκίνηση κυττάρων από το κατεψυγμένο απόθεμα

19. Η διαδικασία εκκίνησης των κυττάρων από το κατεψυγμένο απόθεμα χρησιμοποιείται ότι μια νέα παρτίδα κυττάρων αφαιρείται από το υγρό άζωτο αποθήκευσης για καλλιέργεια και δοκιμή. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται λεπτομερώς στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4). Τα κύτταρα απομακρύνονται από το υγρό άζωτο, αποψύχονται ταχέως, τοποθετούνται σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο σε σωλήνα φυγοκέντρου, φυγοκεντρώνονται σε θερμοκρασία δωματίου, σχηματίζεται νέο εναιώρημα των κυττάρων στο εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο και μεταφέρονται σε φιάλη καλλιέργειας. Το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να αντικαθίσταται την επόμενη ημέρα. Τα κύτταρα H295R καλλιεργούνται σε επωαστήρα στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO₂ 5 %, και το θρεπτικό μέσο ανανεώνεται 2-3 φορές εβδομαδιαίως. Όταν η συρροή των κυττάρων φθάνει το 85-90 % κατά προσέγγιση, θα πρέπει να διαιρούνται. Η διαίρεση των κυττάρων είναι απαραίτητη για να εξασφαλίζεται η υγεία και η ανάπτυξή τους και να διατηρούνται κύτταρα για την εκτέλεση βιοπροσδιορισμών. Τα κύτταρα εκπλύνονται τρεις φορές με φυσιολογικό ορό που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS, χωρίς ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺) και απελευθερώνονται από τη φιάλη καλλιέργειας με την προσθήκη κατάλληλου ενζύμου απόσπασης, π.χ. θρυψίνης, σε PBS (χωρίς ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺). Αμέσως μετά την απόσπαση των κυττάρων από τη φιάλη καλλιέργειας, η ενζυμική δράση διακόπτεται με την προσθήκη εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου σε όγκο τριπλάσιο εκείνου που χρησιμοποιείται για την ενζυμική κατεργασία. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου, φυγοκεντρώνονται σε θερμοκρασία δωματίου, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και σχηματίζεται νέο εναιώρημα του συσσωματώματος κυττάρων σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Κατάλληλη ποσότητα του κυτταρικού διαλύματος τοποθετείται σε νέα φιάλη καλλιέργειας. Η ποσότητα αυτή θα πρέπει να ρυθμίζεται κατά τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται συρροή των κυττάρων εντός 5-7 ημερών. Η συνιστώμενη αναλογία ανακαλλιέργειας είναι 1:3 έως 1:4. Η πλάκα θα πρέπει να σημαίνεται επιμελώς. Τα κύτταρα είναι πλέον έτοιμα να χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό, ενώ τα πλεονάζοντα κύτταρα πρέπει να καταψύχονται σε υγρό άζωτο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 20.

Κατάψυξη κυττάρων H295R (προετοιμασία κυττάρων για φύλαξη σε υγρό άζωτο)

20. Για την προετοιμασία των κυττάρων H295R για κατάψυξη, θα πρέπει να εφαρμόζεται η διαδικασία που περιγράφεται ανωτέρω για τη διαίρεση των κυττάρων έως το στάδιο του σχηματισμού νέου εναιωρήματος του συσσωματώματος κυττάρων στον πυθμένα του σωλήνα φυγοκέντρου. Στο σημείο αυτό, σχηματίζεται νέο εναιώρημα του συσσωματώματος κυττάρων σε θρεπτικό μέσο κατάψυξης. Το διάλυμα μεταγγίζεται σε κρυογονικό φιαλίδιο που φέρει κατάλληλη σήμανση και καταψύχεται στους - 80 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το κρυογονικό φιαλίδιο μεταφέρεται σε υγρό άζωτο για φύλαξη. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται λεπτομερώς στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4).

Καλλιέργεια σε πλάκες και προεπάση των κυττάρων για δοκιμή

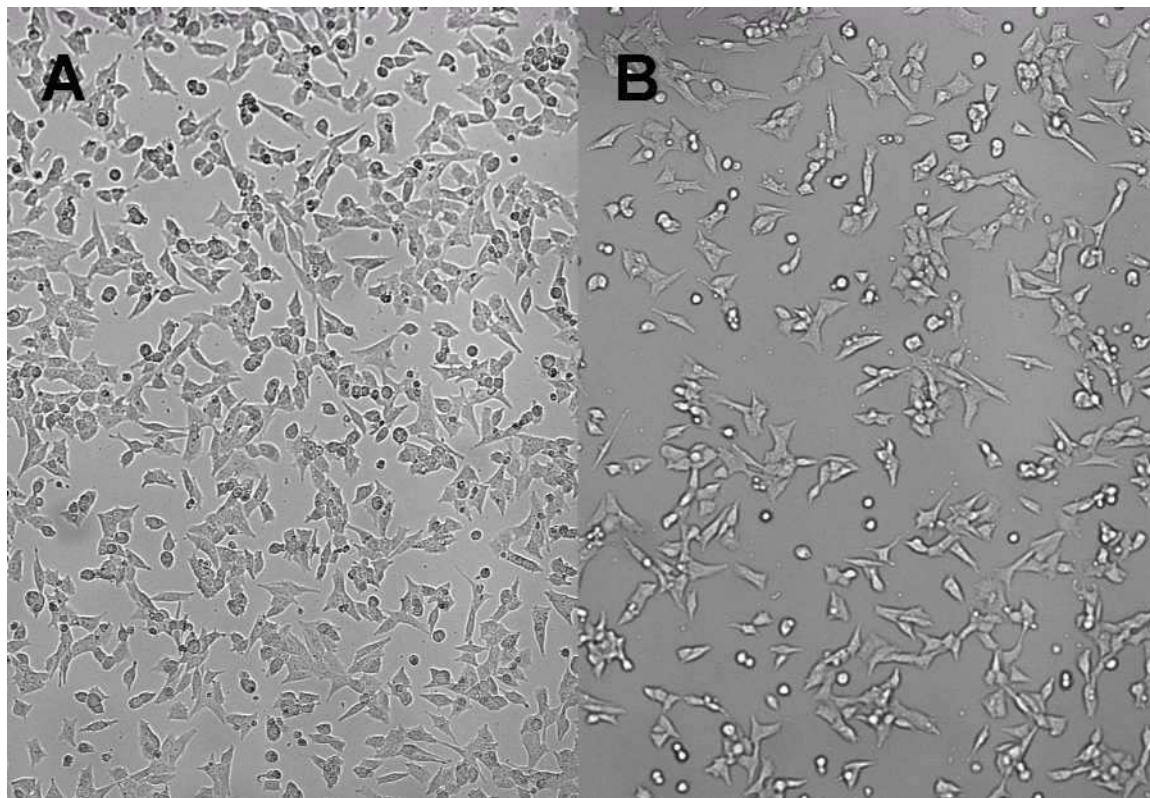
21. Ο απαιτούμενος αριθμός πλακών των 24 κοιλότητων, οι οποίες έχουν προετοιμαστεί όπως περιγράφεται στην παράγραφο 19, εξαρτάται από τον αριθμό των χημικών ουσιών που πρόκειται να υποβληθούν στη δοκιμή και από τη συρροή των κυττάρων στα τρυβλία καλλιέργειας. Κατά κανόνα, μια φιάλη καλλιέργειας (75 cm²) με ποσοστό συρροής κυττάρων 80-90 % παρέχει επαρκή κύτταρα για μία έως 1,5 πλάκα (των 24 κοιλότητων) με στοχευόμενη πυκνότητα 200 000 έως 300 000 κυττάρων ανά ml θρεπτικού μέσου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα συρροή περίπου 50-60 % στις κοιλότητες μετά από 24 ώρες (σχήμα 2). Πρόκειται συνήθως για τη βέλτιστη πυκνότητα κυττάρων για την παραγωγή ορμονών κατά τον προσδιορισμό. Σε υψηλότερες πυκνότητες, μεταβάλλονται τα πρότυπα παραγωγής T και E2. Πριν διεξαχθεί ο προσδιορισμός για πρώτη φορά, συνιστάται να ελεγχονται διαφορετικές πυκνότητες εμβολιασμού, κυμαινόμενες μεταξύ 200 000 και 300 000 κυττάρων ανά ml, και να επιλέγεται για τα επόμενα πειράματα η πυκνότητα που έχει ως αποτέλεσμα συρροή 50-60 % στις κοιλότητες μετά από 24 ώρες.

⁽¹⁾ Ο όρος “νέα παρτίδα” αναφέρεται σε πρόσφατη παρτίδα κυττάρων που έχει ληφθεί από τον οργανισμό ATCC.

⁽²⁾ Ο όρος “κατεψυγμένη παρτίδα” αναφέρεται σε κύτταρα που έχουν προηγουμένως καλλιεργηθεί και καταψυχθεί σε άλλο εργαστήριο εκτός του ATCC.

Σχήμα 2

Φωτομικρογραφία κυττάρων H295R με πυκνότητα εμβολιασμού 50 % σε πλάκα καλλιέργειας των 24 κοιλότητων, μετά από 24 ώρες, στο άκρο (A) και στο κέντρο (B) της κοιλότητας



22. Το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται με σιφόνιο από τη φιάλη καλλιέργειας και τα κύτταρα εκπλύνονται 3 φορές με αποστειρωμένο PBS (χωρίς Ca^{2+} και Mg^{2+}). Προστίθεται διάλυμα ενζύμων (σε PBS) για να αποσπαστούν τα κύτταρα από τη φιάλη καλλιέργειας. Μετά από το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την απόσπαση των κυττάρων, η ενζυμική δράση διακόπτεται με την προσθήκη εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου σε όγκο τριπλάσιο εκείνου που χρησιμοποιείται για την ενζυμική κατεργασία. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρου, φυγοκεντρώνονται σε θερμοκρασία δωματίου, απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και σχηματίζεται νέο εναιώρημα του συσσωματώματος κυττάρων σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο. Υπολογίζεται η πυκνότητα των κυττάρων με τη χρήση, π.χ., αιμοκυτταρόμετρου ή απαριθμητή κυττάρων. Το κυτταρικό διάλυμα αραιώνεται στην επιθυμητή πυκνότητα καλλιέργειας σε πλάκα και αναμειγνύεται πλήρως ώστε να εξασφαλιστεί ομοιογενής πυκνότητα κυττάρων. Τοποθετείται στις πλάκες 1 ml του κυτταρικού διαλύματος ανά κοιλότητα και σημειώνονται τόσο οι πλάκες, όσο και οι κοιλότητες. Οι εμβολιασμένες πλάκες επωάζονται στους 37 °C, σε ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO_2 5 %, για 24 ώρες, ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στις κοιλότητες.

ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

23. Είναι εξαιρετικά σημαντικό να τοποθετούνται στις κοιλότητες ακριβείς όγκοι διαλυμάτων και δειγμάτων κατά την κατανομή των δόσεων, διότι οι όγκοι αυτοί καθορίζουν τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται στους υπολογισμούς των αποτελεσμάτων του προσδιορισμού.
24. Πριν από την έναρξη της κυτταροκαλλιέργειας και από κάθε επόμενη δοκιμή, το εργαστήριο θα πρέπει να αποδεικνύει την ευαισθησία του συστήματος μέτρησης ορμονών που χρησιμοποιεί (παράγραφοι 29-31).
25. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν ορμονικοί προσδιορισμοί που βασίζονται σε αντισώματα, οι χημικές ουσίες που πρόκειται να ελεγχθούν θα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση, πριν από την έναρξη του προσδιορισμού, για να διαπιστωθεί αν μπορούν να παρεμποδίσουν το σύστημα μετρήσεων που χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της T και της E2, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 32.

26. Ο συνιστώμενος διαλύτης για τον προσδιορισμό είναι το DMSO. Εάν χρησιμοποιείται εναλλακτικός διαλύτης, θα πρέπει να προσδιορίζονται τα ακόλουθα:
- η διαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, της φορσκολίνης και του prochloraz στον διαλύτη και
 - η κυτταροτοξικότητα ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύτη.
- Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του διαλύτη συνιστάται να μην υπερβαίνει την αραιώση 1:10 της ελάχιστης κυτταροτοξικής συγκέντρωσής του.
27. Πριν από τη διεξαγωγή της δοκιμής για πρώτη φορά, το εργαστήριο θα πρέπει να εκτελεί κατάλληλο πείραμα που καταδεικνύει την ικανότητά του να διατηρεί και να επιτυγχάνει τις κατάλληλες συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας και πειραματικές συνθήκες που απαιτούνται για τη δοκιμή χημικών ουσιών, όπως περιγράφονται στις παραγράφους 33-35.
28. Όταν διεξάγεται δοκιμή με νέα παρτίδα κυττάρων, θα πρέπει να εκτελείται μέτρηση με πλάκα ποιοτικού ελέγχου πριν χρησιμοποιηθεί η νέα παρτίδα, ώστε να αξιολογούνται οι επιδόσεις των κυττάρων, όπως περιγράφεται στις παραγράφους 36 και 37.

Επιδόσεις του συστήματος μέτρησης ορμονών

Ευαισθησία, ορθότητα και ακρίβεια της μεθόδου και διασταυρούμενη δραστηριότητα με τη μήτρα του δείγματος

29. Κάθε εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί σύστημα μέτρησης ορμονών της επιλογής του για την ανάλυση της παραγωγής T και E2 από κύτταρα H295R, εφόσον αυτό πληροί κριτήρια επιδόσεων, μεταξύ των οποίων το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ). Οι ονομαστικές τιμές του ορίου αυτού είναι 100 pg/ml για την T και 10 pg/ml για την E2 και στηρίζονται στα βασικά επίπεδα ορμονών που παρατηρούνται στις μελέτες επικύρωσης. Ωστόσο, ενδέχεται να είναι σκόπιμα υψηλότερα ή χαμηλότερα επίπεδα, ανάλογα με τα βασικά ορμονικά επίπεδα που έχει επιτύχει το εργαστήριο που εκτελεί τη δοκιμή. Πριν από τη διεξαγωγή δοκιμής με πλάκα ποιοτικού ελέγχου και την εκτέλεση των δοκιμών, το εργαστήριο θα πρέπει να καταδεικνύει ότι με τον ορμονικό προσδιορισμό που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί είναι δυνατόν να μετρηθούν συγκεντρώσεις ορμονών σε εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο με επαρκή ορθότητα και ακρίβεια ώστε να πληρούνται τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου που καθορίζονται στους πίνακες 1 και 5, αναλύοντας εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο που έχει εμβολιαστεί με εσωτερικό μάρτυρα ορμονών. Το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο θα πρέπει να εμβολιάζεται με τρεις τουλάχιστον συγκεντρώσεις κάθε ορμόνης (π.χ. 100, 500 και 2 500 pg/ml για την T και 10, 50 και 250 pg/ml για την E2· εναλλακτικά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χαμηλότερες συγκεντρώσεις εμβολιασμού με T και E2 οι χαμηλότερες δυνατές συγκεντρώσεις βάσει των ορίων ανίχνευσης του επιλεγμένου συστήματος μέτρησης ορμονών) και να αναλύεται. Οι μετρούμενες συγκεντρώσεις ορμονών σε μη εκχυλισμένα δείγματα θα πρέπει να μη διαφέρουν κατά περισσότερο από 30 % από τις ονομαστικές συγκεντρώσεις, ενώ η μεταβλητότητα μεταξύ πολλαπλών μετρήσεων στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 25 % (βλ. επίσης πίνακα 8 για συμπληρωματικά κριτήρια ποιοτικού ελέγχου). Εάν πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια, θεωρείται ότι ο επιλεγμένος ορμονικός προσδιορισμός είναι επαρκώς ορθός και ακριβής και δεν προκαλεί διασταυρούμενη αντίδραση με τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (μήτρα δείγματος) ώστε να αναμένεται σημαντική μεταβολή του αποτελέσματος του προσδιορισμού. Στην περίπτωση αυτή, δεν απαιτείται εκχύλιση των δειγμάτων πριν από τη μέτρηση των ορμονών.
30. Σε περίπτωση που δεν πληρούνται τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου των πινάκων 1 και 8, είναι πιθανόν να πρόκειται για σημαντική επίδραση της μήτρας του δείγματος και θα πρέπει να διεξάγεται πείραμα με εκχυλισμένο εμβολιασμένο θρεπτικό μέσο. Παράδειγμα της διαδικασίας εκχύλισης περιγράφεται στο προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4). Οι συγκεντρώσεις ορμονών θα πρέπει να μετρώνται στα εκχυλισμένα δείγματα εις τριπλούν⁽¹⁾. Εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι, μετά την εκχύλιση, τα συστατικά του θρεπτικού μέσου δεν παρεμποδίζουν τη μέθοδο ανίχνευσης ορμονών, όπως ορίζεται στα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου, όλα τα επόμενα πειράματα θα πρέπει να διεξάγονται με εκχυλισμένα δείγματα. Εάν δεν είναι δυνατή η εκπλήρωση των κριτηρίων ποιοτικού ελέγχου μετά την εκχύλιση, το χρησιμοποιούμενο σύστημα μέτρησης ορμονών δεν είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό στεροειδογένεσης H295R και θα πρέπει να χρησιμοποιείται εναλλακτική μέθοδος ανίχνευσης ορμονών.

Πρότυπη καμπύλη

31. Οι συγκεντρώσεις ορμονών στους μάρτυρες με διαλύτη (ΜΔ) θα πρέπει να βρίσκονται στο ευθύγραμμο τμήμα της πρότυπης καμπύλης και, κατά προτίμηση, κοντά στο κέντρο του, ώστε να εξασφαλίζεται ότι η επαγωγή και η αναστολή της σύνθεσης ορμονών μπορούν να μετρηθούν. Οι αραιώσεις του θρεπτικού μέσου (ή των εκχυλισμάτων) που πρόκειται να μετρηθούν πρέπει να επιλέγονται αναλόγως. Η γραμμική σχέση πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλη στατιστική προσέγγιση.

Δοκιμή χημικής παρεμπόδισης

32. Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση των ορμονών προσδιορισμοί που βασίζονται σε αντισώματα, όπως ενζυμικοί ανοσοπροσοφητικοί προσδιορισμοί (ELISA) και ραδιοανοσοχημικοί προσδιορισμοί (RIA), κάθε χημική ουσία θα πρέπει να ελέγχεται, πριν από την έναρξη της πραγματικής δοκιμής της, για να διαπιστωθεί αν μπορεί να παρεμποδίσει το σύστημα μέτρησης ορμονών που θα χρησιμοποιηθεί [προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4)], διότι ορισμένες χημικές ουσίες μπορούν να παρεμποδίσουν τις δοκιμές αυτές (17). Εάν προκύψει παρεμπόδιση ≥ 20 % της βασικής παραγωγής T και/ή E2, όπως προσδιορίζεται με ανάλυση των ορμονών, όλες οι αραιώσεις του διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας θα πρέπει να υποβάλλονται στη δοκιμή χημικής παρεμπόδισης του ορμονικού

⁽¹⁾ Σημείωση: Εάν απαιτείται εκχύλιση, εκτελούνται τρεις μετρήσεις για κάθε εκχύλιση. Κάθε δείγμα εκχυλίζεται μόνο μία φορά.

προσδιορισμού (που περιγράφεται στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4), σημείο 5.0) για τον καθορισμό της δόσης κατωφλίου στην οποία σημειώνεται σημαντική ($\geq 20\%$) παρεμπόδιση. Εάν η παρεμπόδιση είναι μικρότερη από 30% , τα αποτελέσματα μπορούν να διορθώνονται ώστε να λαμβάνεται υπόψη. Εάν η παρεμπόδιση υπερβαίνει το 30% , τα δεδομένα για τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις είναι άκυρα και θα πρέπει να απορρίπτονται. Εάν μια ελεγχόμενη χημική ουσία παρεμποδίζει σημαντικά ένα σύστημα μέτρησης ορμονών σε περισσότερες από μία μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιείται διαφορετικό σύστημα. Για να αποφευχθεί η παρεμπόδιση από χημικές προσμείξεις, συνιστάται να εκχυλίζονται οι ορμόνες από το θρεπτικό μέσο με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη. Σχετικές μέθοδοι αναφέρονται στην έκθεση επικύρωσης (4).

Πίνακας 1

Κριτήρια επίδοσεων των συστημάτων μέτρησης ορμονών

Παράμετρος	Κριτήριο
Ευαισθησία της μεθόδου μετρήσεων	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) T: 100 pg/ml· E2: 10 pg/ml ^(α)
Απόδοση της εκχύλισης ορμονών (μόνο όταν απαιτείται εκχύλιση)	Τα μέσα ποσοστά ανάκτησης (βάσει μετρήσεων εις τριπλούν) για τις εμβολιζόμενες ποσότητες ορμονών δεν θα πρέπει να αποκλίνουν κατά ποσοστό άνω του 30% από την ποσότητα που προστίθεται.
Χημική παρεμπόδιση (μόνο για συστήματα που βασίζονται σε αντισώματα)	Δεν θα πρέπει να σημειώνεται σημαντική διασταυρούμενη δραστηριότητα ($\geq 30\%$ της βασικής παραγωγής της αντίστοιχης ορμόνης) με οποιαδήποτε από τις ορμόνες που παράγουν τα κύτταρα ^(β) ^(γ) .

^(α) Σημείωση: Τα όρια μέτρησης της μεθόδου στηρίζονται στις τιμές βασικής ορμονικής παραγωγής του πίνακα 5 και εξαρτώνται από τις επιδόσεις. Εάν μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη βασική ορμονική παραγωγή, το όριο μπορεί να είναι μεγαλύτερο.

^(β) Είναι πιθανή η διασταυρούμενη αντίδραση ορισμένων αντισωμάτων της T και της E2 με την ανδροστενδιόνη και την οιστρόνη, αντιστοίχως, σε υψηλότερο ποσοστό. Στις περιπτώσεις αυτές δεν μπορούν να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι επιδράσεις στην 17β-HSD. Ωστόσο, τα σχετικά δεδομένα εξακολουθούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις επιδράσεις στην παραγωγή οιστρογόνων ή ανδρογόνων γενικά. Στις περιπτώσεις αυτές, τα δεδομένα θα πρέπει να εκφράζονται ως αποκρίσεις ανδρογόνων/οιστρογόνων και όχι ως E2 και T.

^(γ) Σε αυτές περιλαμβάνονται οι εξής: χοληστερόλη, πρεγνενολόνη, προγεστερόνη, 11-δεσοξυκορτικοστερόνη, κορτικοστερόνη, αλδοστερόνη, 17α-πρεγνενολόνη, 17α-προγεστερόνη, δεσοξυκορτιζόλη, κορτιζόλη, DHEA, ανδροστενδιόνη, οιστρόνη.

Δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων

33. Πριν υποβάλει σε δοκιμή άγνωστες χημικές ουσίες, το εργαστήριο θα πρέπει να καταδεικνύει ότι είναι ικανό να επιτυγχάνει και να διατηρεί τις κατάλληλες συνθήκες κυταροκαλλιέργειας και δοκιμής που απαιτούνται για την επιτυχή διεξαγωγή του προσδιορισμού, εκτελώντας τη δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων. Δεδομένου ότι οι επιδόσεις ενός προσδιορισμού συνδέονται άμεσα με το εργαστηριακό προσωπικό που τον διεξάγει, οι διαδικασίες αυτές θα πρέπει να επαναλαμβάνονται εν μέρει σε περίπτωση αλλαγής του προσωπικού του εργαστηρίου.
34. Η παρούσα δοκιμή ελέγχου ικανότητας διεξάγεται υπό τις συνθήκες που αναφέρονται στις παραγράφους 38 έως 40, με την έκθεση κυττάρων σε 7 αυξανόμενες συγκεντρώσεις ισχυρών, μέτριων και ασθενών επαγωγών και αναστολέων, καθώς και μιας αρνητικής χημικής ουσίας (βλ. πίνακα 2). Συγκεκριμένα, στις χημικές ουσίες που πρέπει να χρησιμοποιούνται στη δοκιμή περιλαμβάνονται ο ισχυρός επαγωγέας φορσκολίνη (αριθ. CAS 66575-29-9), ο ισχυρός αναστολέας prochloraz (αριθ. CAS 67747-09-5), ο μέτριος επαγωγέας ατραζίνη (αριθ. CAS 1912-24-9), ο μέτριος αναστολέας αμινογλουταϊμιδίο (αριθ. CAS 125-84-8), ο ασθενής επαγωγέας (παραγωγή E2) και ασθενής αναστολέας (παραγωγή T) δισφαινόλη A (αριθ. CAS 80-05-7) και η αρνητική χημική ουσία ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG) (αριθ. CAS 9002-61-3), που εμφανίζονται στον πίνακα 2. Εκτελούνται δοκιμές σε χωριστές πλάκες για όλες τις χημικές ουσίες με τη χρήση του σχήματος του πίνακα 6. Σε κάθε καθημερινή εκτέλεση της δοκιμής για τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται μια πλάκα ποιοτικού ελέγχου (πίνακας 4, παράγραφοι 36-37).

Πίνακας 2

Χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας και συγκεντρώσεις έκθεσης

Χημική ουσία ελέγχου ικανότητας	Συγκεντρώσεις δοκιμής [μM]
Prochloraz	0 ^(α) , 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10
Φορσκολίνη	0 ^(α) , 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30

Χημική ουσία ελέγχου ικανότητας	Συγκεντρώσεις δοκιμής [μM]
Ατραζίνη	0 ^(α) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Αμινογλουταθιμίδιο	0 ^(α) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
Δισφαινόλη Α	0 ^(α) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100
HCG	0 ^(α) , 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100

^(α) Μάρτυρας με διαλύτη (DMSO) (0), 1 μl DMSO/κοιλότητα.

Κατά τη δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων, τα κύτταρα H295R θα πρέπει να εκτίθενται στις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας σε πλάκες των 24 κοιλότητων. Οι δόσεις εκφράζονται σε μM για όλες τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Ως διαλύτης για τις δόσεις θα πρέπει να χρησιμοποιείται DMSO σε αναλογία 0,1 % κατ' όγκο ανά κοιλότητα. Καθεμία από τις συγκεντρώσεις δοκιμής θα πρέπει να ελέγχεται σε τρεις κοιλότητες (πίνακας 6). Χρησιμοποιείται χωριστή πλάκα για κάθε χημική ουσία. Σε κάθε καθημερινή εκτέλεση της δοκιμής συμπεριλαμβάνεται μια πλάκα ποιοτικού ελέγχου.

35. Θα πρέπει να διεξάγονται αναλύσεις κυτταρικής βιωσιμότητας και ορμονών, όπως προβλέπεται στις παραγράφους 42 έως 46. Η τιμή κατωφλίου (η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις, LOEC) και η απόφαση ταξινόμησης θα πρέπει να αναφέρονται και να συγκρίνονται με τις τιμές του πίνακα 3. Τα δεδομένα θεωρούνται αποδεκτά, εάν είναι σύμφωνα με την τιμή LOEC και την απόφαση ταξινόμησης που εμφανίζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3

Τιμές κατωφλίου (LOEC) και αποφάσεις ταξινόμησης για τις χημικές ουσίες ελέγχου ικανότητας

	Αριθ. CAS	LOEC [μM]		Απόφαση ταξινόμησης	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ^(α) (αναστολή)	+ (αναστολή)
Φορσκολίνη	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (επαγωγή)	+ (επαγωγή)
Ατραζίνη	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (επαγωγή)	+ (επαγωγή)
Αμινογλουταθιμί- μίδιο	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (αναστολή)	+ (αναστολή)
Δισφαινόλη Α	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (αναστολή)	+ (επαγωγή)
HCG	9002-61-3	A/A	A/A	Αρνητική	Αρνητική

^(α) +, θετική

A/A: άνευ αντικειμένου, δεδομένου ότι δεν πρέπει να επέρχονται αλλαγές μετά την έκθεση σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις αρνητικού μάρτυρα.

Πλάκα ποιοτικού ελέγχου

36. Η πλάκα ποιοτικού ελέγχου χρησιμοποιείται για την εξακρίβωση των επιδόσεων των κυττάρων H295R υπό πρότυπες συνθήκες καλλιέργειας και για τη δημιουργία ιστορικής βάσης δεδομένων που αφορούν τις συγκεντρώσεις ορμονών σε μάρτυρες με διαλύτη, θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες, καθώς και άλλα μέτρα ποιοτικού ελέγχου, με την πάροδο του χρόνου.

— Οι επιδόσεις των κυττάρων H295R θα πρέπει να αξιολογούνται με τη χρήση πλάκας ποιοτικού ελέγχου για κάθε νέα παρτίδα προερχόμενη από τον ATCC ή μετά την πρώτη χρήση ενός αποθέματος κυττάρων που έχει προηγουμένως καταψυχθεί, εκτός εάν έχει διεξαχθεί δοκιμή ελέγχου ικανότητας εργαστηρίων (παραγράφοι 32-34) με τη συγκεκριμένη παρτίδα κυττάρων.

— Η πλάκα ποιοτικού ελέγχου εξασφαλίζει την πλήρη αξιολόγηση των συνθηκών προσδιορισμού (π.χ. βιωσιμότητα κυττάρων, μάρτυρες με διαλύτη, αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, καθώς και μεταβλητότητα εντός ενός προσδιορισμού και μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών) κατά τις δοκιμές χημικών ουσιών και θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται σε κάθε εκτέλεση της δοκιμής.

37. Η δοκιμή ποιοτικού ελέγχου διεξάγεται σε πλάκα των 24 κοιλότητων και σύμφωνα με τις διαδικασίες επώασης, έκθεσης στις δόσεις, βιωσιμότητας των κυττάρων/κυτταροτοξικότητας, εκχύλισης ορμονών και ανάλυσης ορμονών που περιγράφονται στις παραγράφους 38 έως 46 για τις δοκιμές χημικών ουσιών. Η πλάκα ποιοτικού ελέγχου περιέχει τυφλά δείγματα, μάρτυρες με διαλύτη και δύο συγκεντρώσεις ενός γνωστού επαγωγέα (φορσκολίνη, 1 και 10 μM) και ενός γνωστού αναστολέα (prochloraz, 0,1 και 1 μM) της σύνθεσης E2 και T. Επιπλέον, χρησιμοποιείται μεθανόλη (MeOH) σε

επιλεγμένες κοιλότητες ως θετικός μάρτυρας για τον προσδιορισμό βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Αναλυτική περιγραφή της διάταξης των πλακών παρέχεται στον πίνακα 4. Τα κριτήρια που πρέπει να πληροί η πλάκα ποιοτικού ελέγχου παρατίθενται στον πίνακα 5. Θα πρέπει να επιτυγχάνεται η ελάχιστη βασική παραγωγή T και E2, τόσο στις κοιλότητες που περιέχουν μάρτυρες με διαλύτη όσο και στις κοιλότητες που περιέχουν τυφλά δείγματα.

Πίνακας 4

Διάταξη πλάκας ποιοτικού ελέγχου για τον έλεγχο των επιδόσεων κυττάρων H295R που δεν έχουν εκτεθεί και κυττάρων που έχουν εκτεθεί σε γνωστούς αναστολείς (PRO = prochloraz) και διεγέρτες (FOR = φοροκολίνη) της παραγωγής E2 και T. Μετά τη λήξη του πειράματος έκθεσης και την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, προστίθεται σε όλες τις κοιλότητες MeOH διάλυμα μεθανόλης 70 % για να χρησιμεύει ως θετικός μάρτυρας κυτταροτοξικότητας [βλ. προσδιορισμό κυτταροτοξικότητας στο προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4)]

	1	2	3	4	5	6
A	Τυφλό δείγμα ^(α)	Τυφλό δείγμα ^(α)	Τυφλό δείγμα ^(α)	Τυφλό δείγμα ^(α) (+ MeOH) ^(β)	Τυφλό δείγμα ^(α) (+ MeOH) ^(β)	Τυφλό δείγμα ^(α) (+ MeOH) ^(β)
B	DMSO ^(γ) 1 μl	DMSO ^(γ) 1 μl	DMSO ^(γ) 1 μl	DMSO ^(γ) 1 μl (+ MeOH) ^(β)	DMSO ^(γ) 1 μl (+ MeOH) ^(β)	DMSO ^(γ) 1 μl (+ MeOH) ^(β)
Γ	FOR 1 μM	FOR 1 μM	FOR 1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM	PRO 0,1 μM
Δ	FOR 10 μM	FOR 10 μM	FOR 10 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM	PRO 1 μM

^(α) Στα κύτταρα των κοιλοτήτων τυφλού δείγματος προστίθεται μόνο θρεπτικό μέσο (δηλ. δεν προστίθεται διαλύτης).

^(β) Η μεθανόλη (MeOH) προστίθεται **μετά** τη λήξη της έκθεσης και την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου από τις κοιλότητες αυτές.

^(γ) Μάρτυρας με διαλύτη DMSO (1 μl/κοιλότητα).

Πίνακας 5

Κριτήρια επιδόσεων για την πλάκα ποιοτικού ελέγχου

	T	E2
Βασική παραγωγή ορμονών στο μάρτυρα με τον διαλύτη (ΜΔ)	≥ 5 επί το όριο ποσοτικού προσδιορισμού	≥ 2,5 επί το όριο ποσοτικού προσδιορισμού
Επαγωγή (10 μM φοροκολίνης)	≥ 1,5 επί την τιμή του ΜΔ	≥ 7,5 επί την τιμή του ΜΔ
Αναστολή (1 μM prochloraz)	≤ 0,5 επί την τιμή του ΜΔ	≤ 0,5 επί την τιμή του ΜΔ

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΤΗ ΧΗΜΙΚΗ ΟΥΣΙΑ

38. Τα προεπωασμένα κύτταρα απομακρύνονται από τον επωαστήρα (παράγραφος 21) και εξετάζονται στο μικροσκόπιο για να εξασφαλιστεί ότι βρίσκονται σε καλή κατάσταση (προσκόλληση, μορφολογία) πριν από την έκθεση στις δόσεις.
39. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε θάλαμο βιοασφάλειας και το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και αντικαθίσταται με νέο (1 ml/κοιλότητα). Ο προτιμώμενος διαλύτης για την παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι το DMSO. Ωστόσο, εάν υπάρχουν λόγοι που επιβάλλουν τη χρήση άλλων διαλυτών, θα πρέπει να αναφέρονται. Τα κύτταρα εκτίθενται στην ελεγχόμενη χημική ουσία με την προσθήκη 1 ml κατάλληλου διαλύματος παρακαταθήκης σε DMSO [βλ. προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4)] ανά 1 ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου (όγκος κοιλότητας). Με τον τρόπο αυτό προκύπτει τελική συγκέντρωση 0,1 % DMSO στις κοιλότητες. Για να εξασφαλιστεί επαρκής ανάμειξη, προτιμάται γενικά η

ανάμειξη του κατάλληλου διαλύματος παρακαταθήκης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας σε DMSO με το εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο για να ληφθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση για κάθε δόση και η προσθήκη του μείγματος σε κάθε κοιλότητα αμέσως μετά την απομάκρυνση του παλαιού θρεπτικού μέσου. Εάν χρησιμοποιηθεί η επιλογή αυτή, η συγκέντρωση του DMSO (0,1 %) θα πρέπει να παραμείνει σταθερή σε όλες τις κοιλότητες. Οι κοιλότητες που περιέχουν τις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εξετάζονται οπτικά με τη βοήθεια στερεοσκοπίου για σχηματισμό ιζημάτων ή θολερότητα, που αποτελούν ενδείξεις ατελούς διαλυτοποίησης της ελεγχόμενης χημικής ουσίας. Εάν παρατηρηθούν τέτοια φαινόμενα (θολερότητα, σχηματισμός ιζήματος), εξετάζονται επίσης οι κοιλότητες που περιέχουν τις αμέσως μικρότερες συγκεντρώσεις (και ούτω καθεξής), οι δε συγκεντρώσεις στις οποίες η ουσία δεν διαλύθηκε πλήρως αποκλείονται από την περαιτέρω αξιολόγηση και ανάλυση. Η πλάκα επαναφέρεται στον επωαστήρα σε θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα με συγκέντρωση CO₂ 5 %, όπου παραμένει 48 ώρες. Η διάταξη της πλάκας με την ελεγχόμενη χημική ουσία εμφανίζεται στον πίνακα 6. Τα διαλύματα παρακαταθήκης 1-7 αντιστοιχούν στην τοποθέτηση αυξανόμενων δόσεων της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Πίνακας 6

Δοσολογικό σχήμα για την έκθεση κυττάρων H295R σε ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε πλάκα των 24 κοιλότητων

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Διάλυμα 4	Διάλυμα 4	Διάλυμα 4
B	Διάλυμα 1	Διάλυμα 1	Διάλυμα 1	Διάλυμα 5	Διάλυμα 5	Διάλυμα 5
Γ	Διάλυμα 2	Διάλυμα 2	Διάλυμα 2	Διάλυμα 6	Διάλυμα 6	Διάλυμα 6
Δ	Διάλυμα 3	Διάλυμα 3	Διάλυμα 3	Διάλυμα 7	Διάλυμα 7	Διάλυμα 7

40. Μετά από 48 ώρες, οι πλάκες έκθεσης απομακρύνονται από τον επωαστήρα και κάθε κοιλότητα εξετάζεται στο μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί η κατάσταση των κυττάρων (προσκόλληση, μορφολογία, βαθμός συρροής) και για ενδείξεις κυτταροτοξικότητας. Το θρεπτικό μέσο από κάθε κοιλότητα χωρίζεται σε δύο ίσες ποσότητες (490 μl περίπου), οι οποίες μεταγγίζονται σε δύο χωριστά φιαλίδια που φέρουν κατάλληλη σήμανση (δηλ. η μία από τις δύο γνωστές ποσότητες θα αποτελεί εφεδρικό δείγμα για κάθε κοιλότητα). Για να αποτραπεί η αφυδάτωση των κυττάρων, το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται ανά σειρά ή στήλη και αντικαθίσταται με το θρεπτικό μέσο για τον προσδιορισμό κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Εάν δεν πρόκειται να μετρηθεί αμέσως η κυτταρική βιωσιμότητα/κυτταροτοξικότητα, προστίθενται σε κάθε κοιλότητα 200 μl PBS με ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺. Τα θρεπτικά μέσα καταψύχονται στους - 80 °C έως ότου υποβληθούν σε περαιτέρω επεξεργασία για την ανάλυση ορμονών (βλ. παραγράφους 44-46). Παρόλο που η T και η E2 εντός θρεπτικού μέσου που διατηρείται στους - 80 °C είναι γενικά σταθερές για τουλάχιστον 3 μήνες, η σταθερότητα των ορμονών κατά τη φύλαξη θα πρέπει να τεκμηριώνεται σε κάθε εργαστήριο.
41. Αμέσως μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα/κυτταροτοξικότητα για κάθε πλάκα έκθεσης.

Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας

42. Για να διαπιστωθούν οι δυνητικές επιπτώσεις της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στη βιωσιμότητα των κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατ' επιλογή προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Ο προσδιορισμός θα πρέπει να είναι ικανός να παρέχει το πραγματικό ποσοστό βιώσιμων κυττάρων ανά κοιλότητα ή να έχει αποδειχθεί απευθείας συγκρίσιμος με τον προσδιορισμό Live/Dead® (γραμμική συνάρτηση αυτού) [βλ. προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4)]. Ένας εναλλακτικός προσδιορισμός που έχει αποδειχθεί εξίσου αποτελεσματικός είναι η δοκιμή MTT [βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζόλιο] (18). Η εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας με τη χρήση των ανωτέρω μεθόδων αποτελεί σχετική μέτρηση που δεν παρουσιάζει απαραίτητα γραμμικές σχέσεις με τον απόλυτο αριθμό κυττάρων σε μια κοιλότητα. Για τον λόγο αυτό, θα πρέπει παράλληλα να αξιολογείται υποκειμενικά κάθε κοιλότητα από τον αναλυτή με οπτική εξέταση και να λαμβάνονται και να αρχειοθετούνται ψηφιακές φωτογραφίες των κοιλότητων που περιέχουν τον ΜΔ και τις δύο μεγαλύτερες μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, ώστε να είναι δυνατή η μεταγενέστερη εκτίμηση της πραγματικής κυτταρικής πυκνότητας, εάν χρειαστεί. Εάν από την οπτική εξέταση ή τον προσδιορισμό βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας προκύψει φαινόμενη αύξηση του αριθμού των κυττάρων, θα πρέπει να ελεγχθεί και, εφόσον επαληθευτεί, να αναφερθεί στην έκθεση δοκιμής. Η κυτταρική βιωσιμότητα εκφράζεται σε σχέση με τη μέση απόκριση των ΜΔ, θεωρούμενη ως βιώσιμα κύτταρα σε ποσοστό 100 %, και υπολογίζεται όπως ενδείκνυται για τον χρησιμοποιούμενο προσδιορισμό κυτταρικής βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας. Για τον προσδιορισμό MTT είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ο ακόλουθος τύπος:

% βιώσιμων κυττάρων = (απόκριση στην κοιλότητα – μέση απόκριση στις κοιλότητες στις οποίες προστίθεται MeOH [= 100 % νεκρά κύτταρα]) ÷ (μέση απόκριση στις κοιλότητες με τον ΜΔ — μέση απόκριση στις κοιλότητες στις οποίες προστίθεται MeOH [= 100 % νεκρά κύτταρα])

43. Οι κοιλότητες που παρουσιάζουν βιωσιμότητα μικρότερη από 80 % σε σχέση με τη μέση βιωσιμότητα των ΜΔ (=100 %) δεν θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην τελική ανάλυση δεδομένων. Τυχόν αναστολή της στεροειδογένεσης που συνοδεύεται από κυτταροτοξικότητα σχεδόν 20 % θα πρέπει να αξιολογείται με προσοχή, ώστε να είναι βέβαιο ότι δεν οφείλεται στην κυτταροτοξικότητα.

Ανάλυση ορμονών

44. Κάθε εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιεί σύστημα μέτρησης ορμονών της επιλογής του για την ανάλυση της Τ και της Ε2. Οι εφεδρικές γνωστές ποσότητες θρεπτικού μέσου από κάθε ομάδα αγωγής μπορούν να χρησιμοποιούνται για αραιώσεις ώστε να προκύπτουν συγκεντρώσεις εντός του ευθύγραμμου τμήματος της πρότυπης καμπύλης. Όπως σημειώνεται στην παράγραφο 29, πριν από την εκτέλεση δοκιμών ποιοτικού ελέγχου ή χημικών ουσιών, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καταδεικνύει τη συμμόρφωση του συστήματος μέτρησης ορμονών που χρησιμοποιεί (π.χ. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) με τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου, αναλύοντας εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο που έχει εμβολιαστεί με εσωτερικό μάρτυρα ορμονών. Για να εξασφαλιστεί ότι τα συστατικά του συστήματος δοκιμών δεν παρεμποδίζουν τη μέτρηση των ορμονών, ενδέχεται να πρέπει να εκχυλιστούν οι ορμόνες από το θρεπτικό μέσο πριν από τη μέτρησή τους (βλ. παράγραφο 30 για τις προϋποθέσεις υπό τις οποίες απαιτείται ή δεν απαιτείται εκχύλιση). Συνιστάται να ακολουθούνται για την εκχύλιση οι διαδικασίες του προσαρτήματος III της έκθεσης επικύρωσης (4).
45. Εάν χρησιμοποιούνται σύνολα έτοιμων αντιδραστηρίων (κιτ) του εμπορίου για τη μέτρηση της παραγωγής ορμονών, η ανάλυση των ορμονών θα πρέπει να διεξάγεται όπως υποδεικνύεται στα εγχειρίδια χρήσης των κιτ. Οι περισσότεροι κατασκευαστές κιτ προβλέπουν μια συγκεκριμένη διαδικασία ανάλυσης ορμονών. Οι αραιώσεις των δειγμάτων πρέπει να ρυθμίζονται κατά τρόπο ώστε οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις ορμονών στους μάρτυρες με τον διαλύτη να βρίσκονται στο κέντρο της γραμμικής περιοχής της πρότυπης καμπύλης κάθε προσδιορισμού [προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4)]. Οι τιμές που βρίσκονται εκτός του ευθύγραμμου τμήματος της πρότυπης καμπύλης θα πρέπει να απορρίπτονται.
46. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ορμονών υπολογίζονται ως εξής:

Παράδειγμα:

Εκχύλιση:	450 μl θρεπτικού μέσου
Ανασύσταση σε:	250 μl ρυθμιστικού διαλύματος του προσδιορισμού
Αραίωση στον προσδιορισμό:	1:10 (για να προκύψει δείγμα εντός της γραμμικής περιοχής της πρότυπης καμπύλης)
Συγκέντρωση ορμόνης στον προσδιορισμό:	150 pg/ml (έχει ήδη αναχθεί σε συγκέντρωση ανά ml δείγματος που υποβλήθηκε στον προσδιορισμό)
Ανάκτηση:	89 %
Τελική συγκέντρωση ορμόνης =	(συγκέντρωση ορμονών (ανά ml) ÷ ανάκτηση) (συντελεστής αραιώσης)
Τελική συγκέντρωση ορμόνης =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 μl/450 μl) × 10 = 936,3 pg/ml

Επιλογή συγκεντρώσεων δοκιμής

47. Απαιτούνται τουλάχιστον δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις του προσδιορισμού. Εάν δεν υπάρχουν προηγούμενες πληροφορίες, όπως πληροφορίες για τα όρια διαλυτότητας ή την κυτταροτοξικότητα, που μπορούν να χρησιμεύσουν ως βάση για την επιλογή των συγκεντρώσεων δοκιμής, οι συγκεντρώσεις για την πρώτη εκτέλεση της δοκιμής συνιστάται να απέχουν μεταξύ τους κατά δεκαδικό λογάριθμο, με μέγιστη συγκέντρωση τα 10^{-3} Μ. Εάν η χημική ουσία είναι διαλυτή και δεν είναι κυτταροτοξική σε καμία από τις ελεγχόμενες συγκεντρώσεις και εάν η πρώτη εκτέλεση είναι αρνητική για όλες τις συγκεντρώσεις, το συμπέρασμα πρέπει να επιβεβαιώνεται με μια ακόμα εκτέλεση του προσδιορισμού υπό τις ίδιες

συνθήκες (πίνακας 7). Εάν τα αποτελέσματα της πρώτης εκτέλεσης είναι αμφίσημα (δηλ. η πολλαπλασιαστική μεταβολή σε σχέση με τον ΜΔ είναι στατιστικά σημαντική μόνο σε μία συγκεντρώση) ή θετικά (δηλ. η πολλαπλασιαστική μεταβολή είναι στατιστικά σημαντική σε δύο ή περισσότερες παρακείμενες συγκεντρώσεις), η δοκιμή θα πρέπει να επαναλαμβάνεται όπως υποδεικνύεται στον πίνακα 7, με βελτίωση των επιλεγμένων συγκεντρώσεων δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις δοκιμής για τη δεύτερη και την τρίτη (κατά περίπτωση) εκτέλεση της δοκιμής θα πρέπει να αναπροσαρμόζονται βάσει των αποτελεσμάτων της πρώτης εκτέλεσης, με ομαδοποίηση των συγκεντρώσεων που προκάλεσαν απόκριση με τη χρήση ημιλογαριθμικών διαστημάτων μεταξύ τους (π.χ. εάν η πρώτη εκτέλεση με συγκεντρώσεις 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 και 1 000 μΜ είχε ως αποτέλεσμα επαγωγή στο 1 και στα 10 μΜ, οι συγκεντρώσεις προς έλεγχο στη δεύτερη εκτέλεση θα πρέπει να είναι 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 και 100 μΜ), εκτός εάν πρέπει να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες συγκεντρώσεις για την επίτευξη LOEC. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά τη δεύτερη εκτέλεση τουλάχιστον πέντε συγκεντρώσεις κατώτερες της χαμηλότερης συγκεντρώσεως που ελέγχθηκε κατά την πρώτη εκτέλεση, με τη χρήση ημιλογαριθμικής κλίμακας. Εάν η δεύτερη εκτέλεση δεν επιβεβαιώσει την πρώτη (δηλ. εάν δεν προκύψει στατιστική σημαντικότητα στην προηγούμενη θετική συγκεντρώση ± 1 αύξηση συγκεντρώσεως), απαιτείται τρίτο πείραμα υπό τις αρχικές συνθήκες δοκιμής. Τα αμφίσημα αποτελέσματα της πρώτης εκτέλεσης θεωρούνται αρνητικά εάν η παρατηρούμενη επίδραση δεν επιβεβαιωθεί σε καμία από τις δύο επόμενες εκτελέσεις της δοκιμής. Τα αμφίσημα αποτελέσματα θεωρούνται θετικές αποκρίσεις (επίδραση) όταν η απόκριση μπορεί να επιβεβαιωθεί σε τουλάχιστον μία ακόμη δοκιμή με ± 1 αύξηση συγκεντρώσεως (βλ. διαδικασία ερμηνείας των δεδομένων στην παράγραφο 55).

Πίνακας 7

Πίνακας λήψης αποφάσεων για πιθανά σενάρια αποτελεσμάτων

1η εκτέλεση Σενάριο	2η εκτέλεση		3η εκτέλεση		Απόφαση	
	Απόφαση	Σενάριο	Απόφαση	Σενάριο	Θετική	Αρνητική
Αρνητική	Επιβεβαίωση ^(α)	Αρνητική	Παύση			X
Αρνητική	Επιβεβαίωση ^(α)	Θετική	Βελτίωση ^(β)	Αρνητική		X
Αμφίσημη ^(γ)	Βελτίωση ^(β)	Αρνητική	Επιβεβαίωση ^(α)	Αρνητική		X
Αμφίσημη ^(γ)	Βελτίωση ^(β)	Αρνητική	Επιβεβαίωση ^(α)	Θετική	X	
Αμφίσημη ^(γ)	Βελτίωση ^(β)	Θετική			X	
Θετική	Βελτίωση ^(β)	Αρνητική	Επιβεβαίωση ^(α)	Θετική	X	
Αρνητική	Επιβεβαίωση ^(α)	Θετική	Βελτίωση ^(β)	Θετική	X	
Θετική	Βελτίωση ^(β)	Θετική	Διακοπή		X	

^(α) Επιβεβαίωση του αποτελέσματος της προηγούμενης εκτέλεσης με τη χρήση του ίδιου πειραματικού σχεδιασμού.

^(β) Επανάληψη του προσδιορισμού με ημιλογαριθμικά διαστήματα μεταξύ των συγκεντρώσεων (ομαδοποίηση των συγκεντρώσεων οι οποίες προκάλεσαν σημαντικές διαφορές κατά το προηγούμενο πείραμα).

^(γ) Η πολλαπλασιαστική μεταβολή σε σχέση με τον ΜΔ είναι στατιστικά σημαντική σε μια συγκεντρώση.

Ποιοτικός έλεγχος της πλάκας δοκιμής

48. Πέραν της εκπλήρωσης των κριτηρίων για την πλάκα ποιοτικού ελέγχου, θα πρέπει να πληρούνται και άλλα κριτήρια ποιότητας που αφορούν την αποδεκτή μεταβλητότητα μεταξύ επαναληπτικών κοιλοτήτων και επαναληπτικών πειραμάτων, τη γραμμικότητα και την ευαισθησία των συστημάτων μέτρησης ορμονών, τη μεταβλητότητα μεταξύ επαναληπτικών μετρήσεων ορμονών του ίδιου δείγματος και την ποσοστιαία ανάκτηση εμβολιασμένων ορμονικών δειγμάτων μετά την εκχύλιση του θρεπτικού μέσου (κατά περίπτωση — βλ. παράγραφο 30 σχετικά με τις απαιτήσεις εκχύλισης). Τα κριτήρια αυτά παρατίθενται στον πίνακα 8. Τα δεδομένα θα πρέπει να περικλείονται εντός των αποδεκτών πεδίων τιμών που έχουν καθοριστεί για κάθε παράμετρο για να ληφθούν υπόψη για περαιτέρω αξιολόγηση. Εάν δεν πληρούνται τα κριτήρια αυτά, θα πρέπει να αναφέρεται στο λογιστικό φύλλο ότι δεν πληρούνται τα κριτήρια ποιοτικού ελέγχου για το εξεταζόμενο δείγμα, το οποίο θα πρέπει να υποβάλλεται σε νέα ανάλυση ή να απαλείφεται από το σύνολο δεδομένων.

Πίνακας 8

Αποδεκτά πεδία τιμών και/ή μεταβλητότητα (%) για τις παραμέτρους των πλακών του προσδιορισμού H295R.

LOQ: όριο ποσοτικού προσδιορισμού του συστήματος μέτρησης ορμονών. CV: συντελεστής μεταβλητότητας.
ΜΔ: μάρτυρας με διαλύτη. DPM: διασπάσεις ανά λεπτό

	Σύγκριση	T	E2
Βασική παραγωγή ορμονών στους ΜΔ	Πολλαπλάσια του LOQ	≥ 5πλάσια	≥ 2,5πλάσια
Πειράματα έκθεσης — CV εντός της πλάκας για τους ΜΔ (επαναληπτικές κοιλότητες)	Απόλυτες συγκεντρώσεις	≤ 30 %	≤ 30 %
Πειράματα έκθεσης — CV μεταξύ των πλακών για τους ΜΔ (επαναληπτικά πειράματα)	Πολλαπλασιαστική μεταβολή	≤ 30 %	≤ 30 %
Σύστημα μέτρησης ορμονών — Ευαισθησία	Ανιχνεύσιμος υποπολλαπλασιασμός σε σχέση με τους ΜΔ	≥ 5πλάσια	≥ 2,5πλάσια
Σύστημα μέτρησης ορμονών — CV επαναληπτικών μετρήσεων για τους ΜΔ ^(*)	Απόλυτες συγκεντρώσεις	≤ 25 %	≤ 25 %
Εκχύλιση θρεπτικού μέσου — Ανάκτηση εσωτερικού προτύπου 3H (κατά περίπτωση)	DPM	≥ 65 % της ονομαστικής τιμής	

(*) Αναφέρεται σε επαναληπτικές μετρήσεις του ίδιου δείγματος.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Ανάλυση δεδομένων

49. Για την αξιολόγηση της σχετικής αύξησης/μείωσης της παραγωγής ορμονών υπό την επίδραση χημικής ουσίας, τα αποτελέσματα θα πρέπει να κανονικοποιούνται στη μέση τιμή κάθε πλάκας δοκιμής για τους ΜΔ και να εκφράζονται ως μεταβολή σε σχέση με τους ΜΔ κάθε πλάκας δοκιμής. Όλα τα δεδομένα πρέπει να εκφράζονται ως μέση τιμή ± 1 τυπική απόκλιση (SD).
50. Στην ανάλυση δεδομένων θα πρέπει να περιλαμβάνονται μόνο ορμονικά δεδομένα από κοιλότητες με κυτταροτοξικότητα μικρότερη από 20 %. Οι σχετικές μεταβολές υπολογίζονται ως εξής:

Σχετική μεταβολή = (συγκέντρωση ορμόνης σε κάθε κοιλότητα) ÷ (μέση συγκέντρωση ορμόνης στις κοιλότητες των μαρτύρων με διαλύτη).

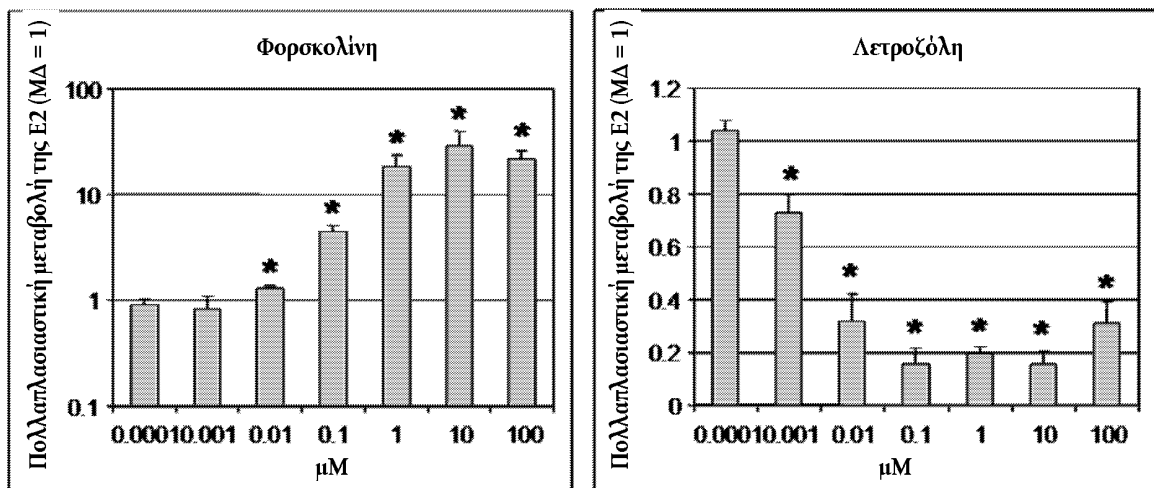
51. Εάν από την οπτική εξέταση της κοιλότητας ή από τον προσδιορισμό βιωσιμότητας/κυτταροτοξικότητας που περιγράφεται στην παράγραφο 42 προκύψει φαινόμενη αύξηση του αριθμού των κυττάρων, θα πρέπει να ελεγχθεί και, εφόσον επαληθευτεί, να αναφερθεί στην έκθεση δοκιμής.
52. Πριν από τη διεξαγωγή στατιστικών αναλύσεων, θα πρέπει να αξιολογούνται οι παραδοχές όσον αφορά την κανονικότητα και την ομοιογένεια διασποράς. Η κανονικότητα θα πρέπει να αξιολογείται με τη χρήση πρότυπων διαγραμμάτων πιθανότητας ή άλλης κατάλληλης στατιστικής μεθόδου (π.χ. δοκιμασία Shapiro-Wilk). Εάν η κατανομή των δεδομένων (πολλαπλασιαστικές μεταβολές) δεν είναι κανονική, θα πρέπει να επιχειρείται μετασχηματισμός των δεδομένων ώστε να προσεγγίζουν την κανονική κατανομή. Εάν η κατανομή των δεδομένων είναι κανονική ή κατά προσέγγιση κανονική, οι διαφορές μεταξύ των ομάδων συγκέντρωσης της χημικής ουσίας και των ΜΔ θα πρέπει να αναλύονται με παραμετρική δοκιμασία (π.χ. δοκιμασία Dunnett), όπου η συγκέντρωση είναι η ανεξάρτητη μεταβλητή και η απόκριση (πολλαπλασιαστική μεταβολή) η εξαρτημένη. Εάν η κατανομή των δεδομένων δεν είναι κανονική, θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλη μη παραμετρική δοκιμασία (π.χ. δοκιμασίες Kruskal-Wallis, Steel's Many-one rank test). Οι διαφορές θεωρούνται σημαντικές όταν $p \leq 0,05$. Οι στατιστικές αξιολογήσεις βασίζονται σε μέσες τιμές για κάθε κοιλότητα που αντιπροσωπεύουν ανεξάρτητα επαναληπτικά σημεία δεδομένων. Προβλέπεται ότι, λόγω των μεγάλων διαστημάτων μεταξύ των δόσεων κατά την πρώτη εκτέλεση της δοκιμής (λογαριθμική κλίμακα), σε πολλές περιπτώσεις δεν θα είναι δυνατή η περιγραφή σαφών σχέσεων συγκέντρωσης-απόκρισης, όπου οι δύο μεγαλύτερες δόσεις θα βρίσκονται στο ευθύγραμμο τμήμα της σιγμοειδούς καμπύλης. Ως εκ τούτου, για τα σύνολα δεδομένων από την πρώτη εκτέλεση ή για οποιοδήποτε άλλο σύνολο δεδομένων σε ανάλογη περίπτωση (π.χ. όταν δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα), χρησιμοποιούνται στατιστικές τεχνικές σταθερής μεταβλητής τύπου I, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

53. Εάν στο ευθύγραμμο τμήμα της καμπύλης βρίσκονται περισσότερα από δύο σημεία δεδομένων και είναι δυνατόν να υπολογιστούν τιμές μέγιστης αποτελεσματικότητας -όπως αναμένεται για ορισμένες από τις δεύτερες εκτελέσεις με τη χρήση ημιλογαριθμικών διαστημάτων μεταξύ των συγκεντρώσεων έκθεσης-, θα πρέπει να χρησιμοποιείται το υπόδειγμα probit ή logit ή άλλο κατάλληλο υπόδειγμα παλινδρόμησης για τον υπολογισμό των αποτελεσματικών συγκεντρώσεων (π.χ. EC50 και EC20).
54. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή γραφήματος (ραβδογράμματα που παριστούν τη μέση τιμή \pm 1 SD) και πίνακα (LOEC/NOEC, κατεύθυνση της επίδρασης και ισχύς της μέγιστης απόκρισης που αποτελεί μέρος του τμήματος δόσης-απόκρισης των δεδομένων) (βλ. παράδειγμα στο σχήμα 3). Η αξιολόγηση των δεδομένων θεωρείται έγκυρη μόνο εάν έχει βασιστεί τουλάχιστον σε δύο ανεξάρτητες δοκιμές. Ένα πείραμα ή μια εκτέλεση δοκιμής θεωρείται ανεξάρτητο εάν έχει διεξαχθεί σε διαφορετική ημερομηνία και με τη χρήση νέου συνόλου διαλυμάτων και μαρτύρων. Η κλίμακα συγκεντρώσεων που χρησιμοποιείται στη δεύτερη και στην τρίτη εκτέλεση (εάν είναι απαραίτητη) της δοκιμής μπορεί να προσαρμόζεται βάσει των αποτελεσμάτων της πρώτης εκτέλεσης, ώστε να καθορίζεται ακριβέστερα η κλίμακα δόσης-απόκρισης που περιέχει την τιμή LOEC (βλ. παράγραφο 47).

Σχήμα 3

Παράδειγμα παρουσίασης και αξιολόγησης δεδομένων που έχουν ληφθεί κατά τη διεξαγωγή του προσδιορισμού H295R, σε μορφή γραφήματος και πίνακα.

Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές από τον μάρτυρα με τον διαλύτη ($p < 0,05$). LOEC: η ελάχιστη συκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις. Μέγιστη μεταβολή: μέγιστη ισχύς της απόκρισης που παρατηρείται σε οποιαδήποτε συκέντρωση σε σχέση με τη μέση απόκριση του μάρτυρα με τον διαλύτη (=1)



Χημική ουσία	LOEC	Μέγιστη μεταβολή
Φορσκολίνη	0,01	0,15πλασιασμός
Λετροζόλη	0,001	29πλασιασμός

Διαδικασία ερμηνείας των δεδομένων

55. Μια ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται θετική εάν η πολλαπλασιαστική επαγωγή διαφέρει στατιστικά ($p \leq 0,05$) από τον μάρτυρα με τον διαλύτη σε δύο παρακείμενες συγκεντρώσεις και τουλάχιστον σε δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις της δοκιμής (πίνακας 7). Μια ελεγχόμενη χημική ουσία θεωρείται αρνητική μετά από δύο ανεξάρτητες εκτελέσεις με αρνητικά αποτελέσματα ή μετά από τρεις εκτελέσεις, εκ των οποίων δύο με αρνητικά αποτελέσματα και μία με αμφίσημα ή θετικά. Εάν τα δεδομένα που έχουν προκύψει από τρία ανεξάρτητα πειράματα δεν πληρούν τα κριτήρια λήψης απόφασης του πίνακα 7, τα πειραματικά αποτελέσματα δεν είναι δυνατόν να ερμηνευτούν. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται σε συγκεντρώσεις οι οποίες υπερβαίνουν τα όρια διαλυτότητας ή είναι κυτταροτοξικές δεν θα πρέπει να περιλαμβάνονται στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Έκθεση δοκιμής

56. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Εγκαταστάσεις δοκιμών

- όνομα και τοποθεσία των εγκαταστάσεων·
- διευθυντής και λοιπό προσωπικό της μελέτης και οι αρμοδιότητές τους στη μελέτη·
- ημερομηνίες έναρξης και λήξης της μελέτης·

Ελεγχόμενη χημική ουσία, αντιδραστήρια και μάρτυρες

- ταυτότητα (ονομασία/αριθμός CAS, κατά περίπτωση), προέλευση, αριθμός παρτίδας, καθαρότητα, προμηθευτής και χαρακτηρισμός της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, των αντιδραστηρίων και των μαρτύρων·
- φυσική μορφή και σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·
- συνθήκες αποθήκευσης και μέθοδος και συχνότητα παρασκευής των δειγμάτων ελεγχόμενων χημικών ουσιών, των αντιδραστηρίων και των μαρτύρων·
- σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας.

Κύτταρα

- προέλευση και τύπος των κυττάρων·
- αριθμός ανακαλλιέργειών (αναγνωριστικό κυτταρικής ανακαλλιέργειας) των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή·
- περιγραφή των διαδικασιών διατήρησης των κυτταροκαλλιέργειών·

Απαιτήσεις πριν από τη δοκιμή (κατά περίπτωση)

- περιγραφή και αποτελέσματα της δοκιμής χημικής παρεμπόδισης του ορμονικού προσδιορισμού·
- περιγραφή και αποτελέσματα των μετρήσεων της απόδοσης της εκχύλισης ορμονών·
- πρότυπες καμπύλες και καμπύλες βαθμονόμησης για όλους τους αναλυτικούς προσδιορισμούς προς διεξαγωγή·
- όρια ανίχνευσης για τους επιλεγμένους αναλυτικούς προσδιορισμούς.

Συνθήκες δοκιμής

- σύνθεση των θρεπτικών μέσων·
- συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·
- πυκνότητα κυττάρων (εκτιμώμενες ή μετρούμενες συγκεντρώσεις κυττάρων μετά από 24 και 48 ώρες)·
- διαλυτότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας (όριο διαλυτότητας, εάν έχει προσδιοριστεί)·
- χρόνος και συνθήκες επώασης·

Αποτελέσματα της δοκιμής

- ανεπεξέργαστα δεδομένα ανά κοιλότητα για τους μάρτυρες και τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες – κάθε επαναληπτική μέτρηση υπό τη μορφή των αρχικών δεδομένων που παρέχει το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της παραγωγής ορμονών (π.χ. απορρόφηση, μονάδες φθορισμού, διασπάσεις ανά λεπτό κ.λπ.)·
- επικύρωση της κανονικότητας των δεδομένων ή επεξήγηση του μετασχηματισμού τους·
- μέσες τιμές απόκρισης ± 1 SD ανά μετρηθείσα κοιλότητα·
- δεδομένα κυτταροτοξικότητας (συγκεντρώσεις δοκιμής που προκάλεσαν κυτταροτοξικότητα)·
- επιβεβαίωση της ικανοποίησης των απαιτήσεων ποιοτικού ελέγχου·
- σχετική μεταβολή σε σύγκριση με τον μάρτυρα με τον διαλύτη, διορθωμένη ως προς την κυτταροτοξικότητα·
- ραβδόγραμμα που παρουσιάζει τη σχετική (πολλαπλασιαστική) μεταβολή σε κάθε συγκέντρωση, την τυπική απόκλιση και τη στατιστική σημαντικότητα, όπως αναφέρεται στις παραγράφους 49-54.

Ερμηνεία των δεδομένων

- Εφαρμογή της διαδικασίας ερμηνείας των δεδομένων στα αποτελέσματα και συζήτηση των ευρημάτων

Συζήτηση

- Προκύπτουν από τη μελέτη ενδείξεις σχετικά με την πιθανότητα να έχουν επηρεαστεί τα δεδομένα για την T/E2 από έμμεσες επιδράσεις στην πορεία σύνθεσης γλυκοκορτικοειδών και μεταλλοκορτικοειδών;

Συμπεράσματα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) OECD (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals, in Appendix 2 to Chapter B.54 of this Annex
- (2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114-124.
- (3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23–30.
- (4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Διαθέσιμη στη διεύθυνση [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]
- (5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [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. Διαθέσιμη στη διεύθυνση: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmv/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) Κεφάλαιο Β.55 του παρόντος παραρτήματος: Βιοπροσδιορισμός Hershberger σε επίμυες: Βραχυπρόθεσμος προσδιορισμός διαλογής για (αντι)ανδρογονικές ιδιότητες.
- (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.
-

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ:

Συρροή: τα περιθώρια κάλυψης ή εξάπλωσης των κυττάρων στην επιφάνεια ή τη μάζα του μέσου καλλιέργειας.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

CV: συντελεστής μεταβλητότητας, ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης μιας κατανομής προς την αριθμητική μέση τιμή της.

CYP: μονοξυγονάσες του κυτοχρώματος P450, ήτοι μια οικογένεια γονιδίων και τα παραγόμενα από αυτά ένζυμα που συμμετέχουν στην κατάλυση μεγάλης ποικιλίας βιοχημικών αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων της σύνθεσης και του μεταβολισμού στεροειδών ορμονών.

DPM: διασπάσεις ανά λεπτό· είναι ο αριθμός των ατόμων σε μια δεδομένη ποσότητα ραδιενεργού υλικού που ανιχνεύεται ότι έχουν διασπαστεί σε ένα λεπτό.

E2: 17β-οιστραδιόλη, το σημαντικότερο οιστρογόνο στα συστήματα θηλαστικών.

Κύτταρα H295R: ανθρώπινα κύτταρα επινεφριδικού καρκινώματος, που έχουν τα χαρακτηριστικά φυσιολογίας των ζωνικά αδιαφοροποιητών κυττάρων των επινεφριδίων ανθρώπινων εμβρύων και εκφράζουν το σύνολο των ενζύμων της πορείας στεροειδογένεσης. Είναι διαθέσιμα από τον οργανισμό ATCC.

Θρεπτικό μέσο κατάψυξης: χρησιμοποιείται για την κατάψυξη και τη φύλαξη κατεψυγμένων κυττάρων. Αποτελείται από το θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης στο οποίο προστίθενται ορός BD NuSerum και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO).

Γραμμική περιοχή: η περιοχή της πρότυπης καμπύλης σε σύστημα μέτρησης ορμονών στην οποία τα αποτελέσματα είναι ανάλογα της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα.

LOQ: Limit of Quantification/όριο ποσοτικού περιορισμού· είναι η μικρότερη ποσότητα μιας χημικής ουσίας που μπορεί να διακριθεί από την απουσία αυτής της χημικής ουσίας (τιμή τυφλού δείγματος) εντός του δηλούμενου διαστήματος εμπιστοσύνης. Για τους σκοπούς της παρούσας μεθόδου, η τιμή LOQ ορίζεται συνήθως από τον κατασκευαστή των συστημάτων δοκιμών, εάν δεν προσδιορίζεται διαφορετικά.

LOEC: η ελάχιστη συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται επιδράσεις, ήτοι το κατώτατο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο η απόκριση του προσδιορισμού διαφέρει στατιστικά από την απόκριση του μάρτυρα με τον διαλύτη.

NOEC: η συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται επιδράσεις, ήτοι η μέγιστη συγκέντρωση που ελέγχθηκε σε προσδιορισμό από τον οποίο δεν προέκυψε θετική απόκριση.

Ανακαλλιέργεια: ο αριθμός των διαιρέσεων των κυττάρων μετά την έναρξη μιας καλλιέργειας από κατεψυγμένο απόδεμα. Η πρώτη καλλιέργεια κυττάρων από το κατεψυγμένο απόδεμα λαμβάνει τον αριθμό ένα (1). Τα κύτταρα που έχουν διαιρεθεί μία φορά ονομάζονται 2η ανακαλλιέργεια και ούτω καθεξής.

PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων του Dulbecco.

Ποιοτικός έλεγχος: τα μέτρα που απαιτούνται για την εξασφάλιση έγκυρων δεδομένων.

Πλάκα ποιοτικού ελέγχου: πλάκα 24 κοιλότητων που περιέχει δύο συγκεντρώσεις του θετικού και του αρνητικού μάρτυρα για την παρακολούθηση των επιδόσεων μιας νέας παρτίδας κυττάρων ή για την παροχή θετικών μαρτύρων για τον προσδιορισμό, όταν υποβάλλονται σε δοκιμή χημικές ουσίες.

Εκτέλεση: ανεξάρτητο πείραμα που χαρακτηρίζεται από νέο σύνολο διαλυμάτων και μαρτύρων.

Θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης: η βάση για την παρασκευή άλλων αντιδραστηρίων. Αποτελείται από μείγμα του τροποποιημένου κατά Dulbecco θρεπτικού μέσου του Eagle και του μίγματος θρεπτικών ουσιών F-12 του Ham (DMEM/F12), σε αναλογία 1:1 σε ρυθμιστικό διάλυμα HEPES 15 mM, χωρίς ερυθρό της φαινόλης ούτε όξινο ανθρακικό νάτριο. Το όξινο ανθρακικό νάτριο προστίθεται ως ρυθμιστικό διάλυμα· βλ. προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4).

Εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο: αποτελείται από θρεπτικό μέσο παρακαταθήκης στο οποίο προστίθενται ορός BD Nu-Serum και μείγμα ITS+ premium· βλ. προσάρτημα II της έκθεσης επικύρωσης (4).

Στεροειδογένεση: η πορεία σύνθεσης των διαφόρων στεροειδών ορμονών από χοληστερόλη. Ορισμένα ενδιάμεσα προϊόντα της πορείας σύνθεσης στεροειδών, όπως η προγεστερόνη και η τεστοστερόνη, είναι σημαντικές ορμόνες από μόνες τους αλλά λειτουργούν και ως πρόδρομοι ορμονών που παράγονται σε μεταγενέστερο στάδιο της συνθετικής πορείας.

T: τεστοστερόνη, ένα από τα δύο σημαντικότερα ανδρογόνα στα συστήματα θηλαστικών.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Πλάκα δοκιμής: η πλάκα στην οποία κύτταρα H295R εκτίθενται σε ελεγχόμενες χημικές ουσίες. Οι πλάκες δοκιμής περιέχουν τον μάρτυρα με τον διαλύτη και τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες σε επτά επίπεδα συγκέντρωσης εις τριπλούν.

Θρυψίνη 1X: αραιωμένο διάλυμα του ενζύμου θρυψίνη, μιας σερινοπρωτεάσης του παγκρέατος, που χρησιμοποιείται για την αποκόλληση των κυττάρων από πλάκες κυτταροκαλλιέργειας· βλ. προσάρτημα III της έκθεσης επικύρωσης (4).

B.58. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΝΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΤΡΩΚΤΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η παρούσα μέθοδος δοκιμών είναι ισοδύναμη με την κατευθυντήρια γραμμή του ΟΟΣΑ για τη διεξαγωγή δοκιμών (TG) 488 (2013). Υπάρχουν μέθοδοι της ΕΕ για ευρύ φάσμα προσδιορισμών μετάλλαξης *in vitro* με τους οποίους είναι δυνατόν να ανιχνευθούν χρωμοσωματικές και/ή γονιδιακές μεταλλάξεις. Ωστόσο, με τις διαθέσιμες μεθόδους δοκιμών για τελικά σημεία *in vivo* (δηλ. χρωμοσωματικές ανωμαλίες και απρογραμματίστη σύνθεση DNA), δεν μετρώνται οι γονιδιακές μεταλλάξεις. Οι προσδιορισμοί μετάλλαξης σε διαγονιδιακά τρωκτικά (ΔΓΤ) καλύπτουν την ανάγκη για πρακτικές και ευρέως διαθέσιμες δοκιμές γονιδιακών μεταλλάξεων *in vivo*.
2. Οι προσδιορισμοί μετάλλαξης σε ΔΓΤ έχουν αναθεωρηθεί εκτενώς (24) (33). Στους προσδιορισμούς αυτούς χρησιμοποιούνται διαγονιδιακοί επίμυες και ποντικούς που φέρουν πολλαπλά αντίγραφα ενσωματωμένων στο χρωμόσωμα αναπαραγόμενων φορέων που είναι πλασμίδια ή φάγοι. Τα διαγονίδια περιέχουν γονίδια αναφοράς για την ανίχνευση διαφόρων ειδών μεταλλάξεων που επάγονται *in vivo* από τις ελεγχόμενες χημικές ουσίες.
3. Οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε τρωκτικά βαθμολογούνται με ανάκτηση του διαγονιδίου και ανάλυση του φαινότυπου του γονιδίου αναφοράς σε βακτηριακό ξενιστή από τον οποίο λείπει το γονίδιο αναφοράς. Με τους προσδιορισμούς γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ μετρώνται οι μεταλλάξεις που επάγονται σε γενετικώς ουδέτερα γονίδια, τα οποία ανακτώνται σχεδόν από οποιονδήποτε ιστό του τρωκτικού. Συνεπώς, οι προσδιορισμοί αυτοί παρακάμπτουν πολλούς από τους υφιστάμενους περιορισμούς που συνδέονται με τη μελέτη της γονιδιακής μετάλλαξης *in vivo* σε ενδογενή γονίδια (π.χ. περιορισμένοι ιστοί κατάλληλοι για ανάλυση, αρνητική/θετική επιλογή έναντι των μεταλλάξεων).
4. Το βάρος της μαρτυρίας υποδηλώνει ότι τα διαγονίδια αντιδρούν στις μεταλλαξιογόνες ουσίες κατά τρόπο παρόμοιο με τα ενδογενή γονίδια, ιδίως όσον αφορά την ανίχνευση υποκαταστάσεων ζευγών βάσεων, μεταλλάξεων αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης και μικρών ελλείψεων και παρεμβολών (24).
5. Στο πλαίσιο των διεθνών ημερίδων για τις δοκιμές γονιδιοτοξικότητας (IWGT) εγκρίθηκε η χρήση προσδιορισμών γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων *in vivo* και διατυπώθηκαν συστάσεις σχετικά με πρωτόκολλο για την εφαρμογή τους (15) (29). Η παρούσα μέθοδος δοκιμών βασίζεται σε αυτές τις συστάσεις. Περαιτέρω ανάλυση υπέρ της χρήσης του *en vivo* πρωτοκόλλου περιλαμβάνεται στη βιβλιογραφική παραπομπή (16).
6. Αναμένεται ότι στο μέλλον ενδέχεται να καταστεί δυνατός ο συνδυασμός του προσδιορισμού γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ με μελέτη τοξικότητας με επαναλαμβανόμενη δόση (κεφάλαιο B.7 του παρόντος παραρτήματος). Ωστόσο, απαιτούνται δεδομένα για να εξασφαλιστεί ότι η ευαισθησία των προσδιορισμών γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ δεν επηρεάζεται από το συντομότερο, μονοήμερο χρονικό διάστημα μεταξύ του τέλους της περιόδου χορήγησης και του χρόνου δειγματοληψίας, το οποίο χρησιμοποιείται στην τοξικολογική μελέτη με επαναλαμβανόμενη δόση, έναντι του τριήμερου που χρησιμοποιείται στους προσδιορισμούς γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ. Απαιτούνται επίσης δεδομένα για να καταδειχθεί ότι η απόδοση της δοκιμής επαναλαμβανόμενης δόσης δεν επηρεάζεται δυσμενώς από τη χρήση συγκεκριμένου στελέχους διαγονιδιακών τρωκτικών αντί των παραδοσιακών στελεχών τρωκτικών. Όταν θα είναι διαθέσιμα τα δεδομένα αυτά, η παρούσα μέθοδος δοκιμών θα επικαιροποιηθεί.
7. Οι ορισμοί των βασικών όρων παρατίθενται στο προσάρτημα.

ΑΡΧΙΚΕΣ ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ

8. Οι προσδιορισμοί γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ για τους οποίους υπάρχουν επαρκή δεδομένα που τεκμηριώνουν τη χρήση τους στην παρούσα μέθοδο δοκιμών είναι οι εξής: προσδιορισμοί σε ποντικούς που φέρουν βακτηριοφάγους με γονίδιο *lacZ* (μοντέλο Muta™Mouse), σε ποντικούς που φέρουν πλασμίδια με γονίδιο *lacZ*, σε ποντικούς και επίμυες *gpt delta* (γονίδια *gpt* και *Sp1*) και σε ποντικούς και επίμυες με γονίδιο *lacI* (μοντέλο Big Blue®), εκτελούμενοι υπό πρότυπες συνθήκες. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο προσδιορισμός θετικής επιλογής ως προς το γονίδιο *cII* για την αξιολόγηση των μεταλλάξεων στα μοντέλα Big Blue® και Muta™Mouse. Η μεταλλαξιογένεση στα μοντέλα ΔΓΤ αξιολογείται κατά κανόνα ως συχνότητα μεταλλάξεων. Ωστόσο, εάν απαιτείται, μπορούν να προκύψουν πρόσθετες πληροφορίες από μοριακή ανάλυση των μεταλλάξεων (βλ. παράγραφο 24).
9. Οι ανωτέρω δοκιμές γονιδιακής μετάλλαξης *in vivo* σε τρωκτικά είναι ιδιαίτερες σημαντικές για την εκτίμηση του κινδύνου μεταλλαξιογένεσης, καθώς οι αποκρίσεις κατά τους προσδιορισμούς εξαρτώνται από τον μεταβολισμό *in vivo*, τη φαρμακοκινητική, τις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA και από τη διαβλαβική σύνθεση DNA (Translesion DNA Synthesis/επιδιορθωτικός μηχανισμός TLS), παρόλο που αυτά ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ ζωικών ειδών, ιστών και τύπων βλάβης του DNA. Ο προσδιορισμός γονιδιακών μεταλλάξεων *in vivo* είναι χρήσιμος για την περαιτέρω διερεύνηση μεταλλαξιογόνων επιδράσεων που ανιχνεύονται με σύστημα *in vitro* και για την αξιοποίηση των αποτελεσμάτων δοκιμών στις οποίες χρησιμοποιούνται άλλα τελικά σημεία *in vivo* (24). Η γονιδιακή μετάλλαξη, πέραν της αιτιώδους σχέσης της με την επαγωγή καρκίνου, αποτελεί σημαντικό τελικό σημείο για την πρόγνωση άλλων ασθενειών πλην του καρκίνου που βασίζονται σε μετάλλαξη σε σωματικούς ιστούς (12) (13), καθώς και ασθενειών που μεταδίδονται μέσω των γεννητικών κυττάρων.

10. Εάν υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία ή αντίστοιχος μεταβολίτης δεν φτάνει σε κανένα από τους ιστούς που ενδιαφέρουν, δεν είναι σκόπιμος ο προσδιορισμός γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

11. Στους προσδιορισμούς που περιγράφονται στην παράγραφο 8, το γονίδιο-στόχος προέρχεται από βακτηρίδιο ή βακτηριοφάγο και το μέσο ανάκτησης από το γονιδιωματικό DNA των τροφτικών είναι η ενσωμάτωση του διαγονιδίου σε αναπαραγόμενο φορέα, ο οποίος είναι βακτηριοφάγος λ ή πλασμίδιο. Η διαδικασία περιλαμβάνει εκχύλιση του γονιδιωματικού DNA από τον ιστό των τροφτικών που ενδιαφέρει, *in vitro* επεξεργασία του γονιδιωματικού DNA (δηλ. πακετάρισμα των φορέων λ ή συνένωση και ηλεκτροπόρωση των πλασμιδίων για την ανάκτηση του αναπαραγόμενου φορέων) και, στη συνέχεια, ανίχνευση μεταλλάξεων σε βακτηριακούς ξενιστές υπό κατάλληλες συνθήκες. Στους προσδιορισμούς χρησιμοποιούνται ουδέτερα διαγονίδια που είναι εύκολα ανακτήσιμα από τους περισσότερους ιστούς.
12. Το βασικό πείραμα γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ περιλαμβάνει αγωγή των τροφτικών με χημική ουσία για ένα ορισμένο χρονικό διάστημα. Οι χημικές ουσίες μπορούν να χορηγηθούν μέσω οποιασδήποτε κατάλληλης οδού, συμπεριλαμβανομένης της εμφύτευσης (π.χ. δοκιμή με ιατροτεχνολογικό προϊόν). Το συνολικό χρονικό διάστημα κατά το οποίο χορηγούνται δόσεις σε ένα ζώο καλείται περίοδος χορήγησης. Μετά τη χορήγηση ακολουθεί συνήθως ένα χρονικό διάστημα, πριν από τη θανάτωση, στη διάρκεια του οποίου δεν χορηγείται η χημική ουσία και οι βλάβες του DNA που δεν έχουν επιδιορθωθεί μετατρέπονται σε σταθερές μεταλλάξεις. Στη βιβλιογραφία, το συγκεκριμένο διάστημα αναφέρεται ποικιλοτρόπως, ως χρόνος εκδήλωσης, χρόνος σταθεροποίησης ή χρόνος έκφρασης, ενώ το τέλος του είναι ο χρόνος δειγματοληψίας (15) (29). Μετά τη θανάτωση του ζώου, το γονιδιωματικό DNA απομονώνεται από τον ή τους ιστούς που ενδιαφέρουν και καθαρίζεται.
13. Τα δεδομένα από πολλαπλά πακεταρίσματα/συνενώσεις για μεμονωμένους ιστούς ανά ζώο συνήθως συναρμολογούνται και η συχνότητα μεταλλάξεων αξιολογείται γενικά με τη χρήση συνολικά 10^5 έως 10^7 μονάδων σχηματισμού πλάκας ή σχηματισμού αποικίας. Όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι θετικής επιλογής, προσδιορίζεται ο συνολικός αριθμός μονάδων σχηματισμού πλάκας με χωριστό σύνολο μη επιλεκτικών πλακών.
14. Έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι θετικής επιλογής για τη διευκόλυνση της ανίχνευσης μεταλλάξεων του γονιδίου *gpt* [επίμυες και ποντικοί *gpt* δέλτα, φαινότυπος *gpt*- (20) (22) (28)] και του γονιδίου *lacZ* [μοντέλο ποντικών *Muta*TMMouse ή ποντικοί που φέρουν πλασμίδιο με το γονίδιο *lacZ* (3) (10) (11) (30)], ενώ οι μεταλλάξεις του γονιδίου *lacI* σε ζώα του μοντέλου Big Blue® ανιχνεύονται με μη επιλεκτική μέθοδο, με την οποία τα μεταλλάγματα εντοπίζονται μέσω της δημιουργίας έγχρωμων (μπλε) πλακών. Μεθοδολογία θετικής επιλογής εφαρμόζεται επίσης για την ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων που εμφανίζονται στο γονίδιο *cII* του αναπαραγόμενου φορέα λ βακτηριοφάγου [ποντικοί ή επίμυες Big Blue® και ποντικοί *Muta*TMMouse (17)], καθώς και μεταλλάξεων έλλειψης στα γονίδια *λ red* και *gam* [επιλογή *Spr*⁺ σε ποντικούς και επίμυες *gpt* δέλτα (21) (22) (28)]. Η συχνότητα μεταλλάξεων υπολογίζεται με διαίρεση του αριθμού των πλακών/πλασμιδίων που περιέχουν μεταλλάξεις στο διαγονίδιο δια του συνολικού αριθμού των πλακών/πλασμιδίων που ανακτώνται από το ίδιο δείγμα DNA. Στις μελέτες γονιδιακής μετάλλαξης σε ΔΓΤ, η αναφερόμενη στις εκθέσεις παράμετρος είναι η συχνότητα μεταλλάξεων. Επιπλέον, η συχνότητα μεταλλάξεων μπορεί να προσδιοριστεί ως κλάσμα κυττάρων που φέρουν ανεξάρτητες μεταλλάξεις. Ο υπολογισμός αυτός πρέπει να διορθώνεται ως προς την κλωνική επέκταση, με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ανακτώμενων μεταλλαγμάτων (24).
15. Οι μεταλλάξεις που βαθμολογούνται στους προσδιορισμούς σημειακών μεταλλάξεων των γονιδίων *lacI*, *lacZ*, *cII* και *gpt* είναι κυρίως μεταλλάξεις υποκατάστασης ζευγών βάσεων, μεταλλάξεις αλλαγής του πλαισίου ανάγνωσης και μικρές παρεμβολές/ελλείψεις. Το σχετικό ποσοστό αυτών των ειδών μετάλλαξης μεταξύ των αυτόματων μεταλλάξεων είναι παρόμοιο με το ποσοστό που παρατηρείται στο ενδογενές γονίδιο *Hprt*. Οι μεγάλες ελλείψεις ανιχνεύονται μόνο τους προσδιορισμούς επιλογής του *Spr*⁺ και πλασμιδίων με το γονίδιο *lacZ* (24). Οι μεταλλάξεις που ενδιαφέρουν είναι όσες εμφανίζονται *in vivo* σε ποντικούς ή επίμυες. Οι μεταλλάξεις *in vitro* και *ex vivo* που ενδέχεται να εμφανιστούν κατά την ανάκτηση, την αντιγραφή ή την επιδιόρθωση φάγων/πλασμιδίων είναι σχετικά σπάνιες και, σε ορισμένα συστήματα, μπορούν να προσδιοριστούν ειδικά ή να αποκλειστούν από το σύστημα βακτηριακού ξενιστή/θετικής επιλογής.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Προετοιμασία

Επιλογή ζωικού είδους

16. Υπάρχουν σήμερα διάφορα μοντέλα ανίχνευσης γονιδιακών μεταλλάξεων σε διαγονιδιακούς ποντικούς, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρύτερα από όσο τα μοντέλα με διαγονιδιακούς επίμυες. Εάν ο επίμυς αποτελεί σαφώς καταλληλότερο μοντέλο σε σύγκριση με τον ποντικό (π.χ. κατά τη διερεύνηση του μηχανισμού καρκινογένεσης στην περίπτωση όγκου που εμφανίζεται μόνο σε επίμυες ή για τη συσχέτιση με μελέτη τοξικότητας σε επίμυες ή εάν είναι γνωστό ότι ο μεταβολισμός των επιμύων είναι πιο αντιπροσωπευτικός του ανθρώπινου μεταβολισμού), θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο χρήσης μοντέλων με διαγονιδιακούς επίμυες.

Συνθήκες στέγασης και διατροφής

17. Η θερμοκρασία του θαλάμου πειραματόζων θα πρέπει, υπό ιδανικές συνθήκες, να είναι 22 °C (\pm 3 °C). Αν και η σχετική υγρασία θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 30 % και, κατά προτίμηση, να μην υπερβαίνει το 70 %, εκτός από τις περιόδους καθαρισμού του θαλάμου, εν τούτοις στόχος θα πρέπει να είναι η διατήρηση σχετικής υγρασίας 50-60 %. Ο φωτισμός θα πρέπει να είναι τεχνητός με ημερήσια φωτοπερίοδο 12 ωρών. Για τη διατροφή μπορούν να χρησιμοποιούνται συνήθη εργαστηριακά σιτηρέσια, με απεριόριστη παροχή πόσιμου νερού. Όταν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με την τροφή, η ανάγκη επαρκούς πρόσμειξης της ουσίας είναι δυνατών να επηρεάσει την επιλογή σιτηρεσίου. Τα ζώα θα πρέπει να στεγάζονται σε μικρές ομάδες (όχι περισσότερα από πέντε) του ίδιου φύλου, εφόσον δεν αναμένεται επιθετική συμπεριφορά. Εάν αιτιολογείται επιστημονικά, τα ζώα μπορούν να στεγάζονται ατομικά.

Προετοιμασία των ζώων

18. Υγιή, νεαρά, σεξουαλικά ώριμα ενήλικα ζώα (ηλικίας 8-12 εβδομάδων κατά την έναρξη της αγωγής) κατανέμονται τυχαία στις ομάδες αγωγής και μαρτύρων. Τα ζώα λαμβάνουν αποκλειστικό αναγνωριστικό και εγκλιματίζονται στις εργαστηριακές συνθήκες για πέντε τουλάχιστον ημέρες. Η διατάξη των κλωβών θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα επιδράσεων οφειλόμενων στη θέση τους. Στην αρχή της μελέτης, οι διαφορές βάρους μεταξύ των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το \pm 20 % του μέσου βάρους κάθε φύλου.

Παρασκευή των δόσεων

19. Οι στερεές ελεγχόμενες χημικές ουσίες θα πρέπει να διαλύονται ή να εναιωρούνται σε κατάλληλους διαλύτες ή φορείς ή να αναμειγνύονται με την τροφή ή το πόσιμο νερό, πριν χορηγηθούν στα ζώα. Οι υγρές ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως έχουν ή να αραιώνονται πριν από τη χορήγηση. Σε περίπτωση έκθεσης μέσω της εισπνοής, οι ελεγχόμενες χημικές ουσίες μπορούν να χορηγούνται ως αέριο, ατμοί ή στερεό/υγρό αερόλυμα, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πρόσφατα παρασκευάσματα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εκτός εάν η φύλαξη των παρασκευασμάτων είναι αποδεκτή βάσει των δεδομένων που αφορούν τη σταθερότητα της ουσίας.

Συνθήκες δοκιμής*Διαλύτης/φορέας*

20. Ο διαλύτης/φορέας θα πρέπει να μην έχει τοξικές επιδράσεις στους χρησιμοποιούμενους όγκους δόσεων, ούτε να υπάρχουν υπόνοιες για πιθανή χημική αντίδρασή του με την ελεγχόμενη χημική ουσία. Εάν ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης/φορέας δεν είναι ευρέως γνωστός, η χρήση του θα πρέπει να τεκμηριώνεται με δεδομένα αναφοράς από τα οποία προκύπτει ότι είναι συμβατός. Συνιστάται να εξετάζεται πρώτα η χρήση υδατικού διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι δυνατόν.

Θετικοί μάρτυρες

21. Θα πρέπει κανονικά να χρησιμοποιούνται ζώα ως συντρέχοντες θετικοί μάρτυρες. Ωστόσο, τα εργαστήρια που έχουν αποδείξει την ικανότητά τους (βλ. παράγραφο 23) και εφαρμόζουν τους συγκεκριμένους προσδιορισμούς ως συνήθη πρακτική μπορούν να συμπεριλαμβάνουν σε κάθε μελέτη, για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της μεθόδου, DNA από ζώα που έχουν υποβληθεί στο παρελθόν σε αγωγή με θετική ουσία. Το εν λόγω DNA από προηγούμενα πειράματα πρέπει να έχει ληφθεί από τα ίδια είδη και ιστούς που ενδιαφέρουν και να έχει φυλαχθεί καταλλήλως (βλ. παράγραφο 36). Όταν χρησιμοποιούνται συντρέχοντες θετικοί μάρτυρες, οι θετικές ουσίες δεν είναι απαραίτητο να χορηγούνται από την ίδια οδό όπως η ελεγχόμενη χημική ουσία. Ωστόσο, πρέπει να είναι γνωστό ότι προκαλούν μεταλλάξεις σε έναν ή περισσότερους ιστούς που ενδιαφέρουν την ελεγχόμενη χημική ουσία. Οι δόσεις των χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε να έχουν ασθενείς ή μέτριες επιδράσεις μέσω των οποίων αξιολογούνται με ορθή κρίση οι επιδόσεις και η ευαισθησία του προσδιορισμού. Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες και ορισμένοι από τους ιστούς-στόχους τους περιλαμβάνονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1

Παραδείγματα χημικών ουσιών που αποτελούν θετικούς μάρτυρες και ορισμένοι από τους ιστούς-στόχους τους

Χημική ουσία που λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας και αριθμός CAS	Ονομασία EINECS και αριθμός EINECS	Χαρακτηριστικά	Ιστός-στόχος της μετάλλαξης	
			Επίμυς	Ποντικός
N-αιθυλο-N-νιτρωδουρία [αριθ. CAS 759-73-9]	N-αιθυλο-N-νιτρωδουρία [212-072-2]	Μεταλλαξιόγόνος ουσία με άμεση δράση	Ήπαρ, πνεύμονες	Μυελός των οστών, κόλον, επιθήλιο του κόλου, έντερο, ήπαρ, πνεύμονες, σπλήνας, νεφροί, θυλακικά κύτταρα των ωοθηκών, αρσενικά γεννητικά κύτταρα

Χημική ουσία που λειτουργεί ως θετικός μάρτυρας και αριθμός CAS	Ονομασία EINECS και αριθμός EINECS	Χαρακτηριστικά	Ιστός-στόχος της μετάλλαξης	
			Επίμυς	Ποντικός
Καρβαμιδικός αιθυλεστερας (ουρεθάνη) [αριθ. CAS 51-79-6]	Ουρεθάνη [200-123-1]	Μεταλλαξιόγonos ουσία, απαιτεί μεταβολισμό αλλά έχει μόνο ασθενείς επιδράσεις		Μυελός των οστών, προστόμαχος, λεπτό έντερο, ήπαρ, πνεύμονες, σπλήνας
2,4-διαμινοτολουόλιο [αριθ. CAS 95-80-7]	4-μεθυλο- m-φαινυλενο-διαμίνη [202-453-1]	Μεταλλαξιόγonos ουσία, απαιτεί μεταβολισμό, είναι επίσης θετική στον προσδιορισμό Sp1	Ήπαρ	Ήπαρ
Βενζο[a]πυρένιο [αριθ. CAS 50-32-8]	Βενζο[d,e,f]χρυσένιο [200-028-5]	Μεταλλαξιόγonos ουσία, απαιτεί μεταβολισμό	Ήπαρ, επίπλοα	Μυελός των οστών, μαστοί, κόλον, προστόμαχος, αδενικό τμήμα στομάχου, καρδιά, ήπαρ, πνεύμονες, αρσενικά γεννητικά κύτταρα

Αρνητικοί μάρτυρες

22. Για κάθε χρόνο δειγματοληψίας θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και αρνητικοί μάρτυρες, στους οποίους χορηγείται μόνο ο διαλύτης ή ο φορέας και οι οποίοι, κατά τα άλλα, υφίστανται την ίδια μεταχείριση όπως οι ομάδες αγωγής. Εάν δεν υπάρχουν ιστορικά ή δημοσιευμένα δεδομένα για μάρτυρες από τα οποία προκύπτει ότι ο επιλεγμένος διαλύτης/φορέας δεν επάγει επιβλαβείς ή μεταλλαξιόγones επιδράσεις, θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται επίσης, για κάθε χρόνο δειγματοληψίας, μάρτυρες που δεν υποβάλλονται σε αγωγή ώστε να διαπιστώνεται η δυνατότητα αποδοχής των μαρτύρων με τον φορέα.

Έλεγχος ικανότητας εργαστηρίων

23. Η ικανότητα εκτέλεσης των παρόντων προσδιορισμών θα πρέπει να τεκμηριώνεται με απόδειξη της ικανότητας αναπαραγωγής των αναμενόμενων αποτελεσμάτων από δημοσιευμένα δεδομένα (24) που αφορούν: 1) τις συχνότητες μεταλλάξεων με χημικές ουσίες που αποτελούν θετικούς μάρτυρες (συμπεριλαμβανομένων ασθενών αποκρίσεων), όπως οι ουσίες του πίνακα 1, με μη μεταλλαξιόγones ουσίες και με μάρτυρες με τον φορέα και 2) την ανάκτηση διαγονιδίων από γονιδιωμικό DNA (π.χ. απόδοση πακεταρίσματος).

Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των μεταλλαγμάτων

24. Στην περίπτωση των εφαρμογών στο πλαίσιο ρυθμίσεων, δεν απαιτείται προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο DNA των μεταλλαγμάτων, ιδίως όταν λαμβάνεται σαφές θετικό ή αρνητικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, τα δεδομένα για την αλληλουχία ενδέχεται να είναι χρήσιμα όταν παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των ατόμων. Στις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας για να αποκλειστεί η πιθανότητα jackpot ή κλωνικών συμβάντων, με τον προσδιορισμό του ποσοστού μοναδικών μεταλλαγμάτων από συγκεκριμένο ιστό. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας περίπου 10 μεταλλαγμάτων ανά ιστό και ανά ζώο προβλέπεται ότι θα επαρκεί, προκειμένου να κριθεί απλώς αν τα κλωνικά μεταλλάγματα συνεισφέρουν στη συχνότητα μεταλλάξεων. Ενδέχεται να χρειάζεται προσδιορισμός της αλληλουχίας έως και 25 μεταλλαγμάτων για τη μαθηματική διόρθωση της συχνότητας μεταλλάξεων ώστε να ληφθεί υπόψη η κλωνικότητα. Το ενδεχόμενο προσδιορισμού της αλληλουχίας των μεταλλαγμάτων μπορεί επίσης να εξετάζεται όταν διαπιστώνονται μικρές αυξήσεις της συχνότητας μεταλλάξεων (δηλ. ελάχιστη υπέρβαση των τιμών των μαρτύρων που δεν υποβάλλονται σε αγωγή). Οι διαφορές όσον αφορά το φάσμα μεταλλαγμένων αποικιών μεταξύ των ζώων που έχουν υποβληθεί σε αγωγή και εκείνων που δεν έχουν είναι δυνατόν να στηρίζουν την υπόθεση μεταλλαξιόγonus επίδρασης (29). Τα φάσματα μεταλλάξεων μπορεί να είναι χρήσιμα και για τη διατύπωση μηχανιστικών υποθέσεων. Όταν πρόκειται να συμπεριληφθεί προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο πρωτόκολλο της μελέτης, θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη μέριμνα κατά τον σχεδιασμό της, ιδίως όσον αφορά τον αριθμό των μεταλλαγμάτων ανά δείγμα, η αλληλουχία των οποίων θα προσδιορίζεται, ώστε να επιτυγχάνεται επαρκής ισχύς ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο στατιστικό μοντέλο (βλ. παράγραφο 43).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αριθμός και φύλο των ζώων

25. Ο αριθμός ζώων ανά ομάδα θα πρέπει να προκαθορίζεται ώστε να επαρκεί για την επίτευξη της στατιστικής ισχύος που είναι απαραίτητη για την ανίχνευση τουλάχιστον του διπλασιασμού της συχνότητας μεταλλάξεων. Οι ομάδες αποτελούνται τουλάχιστον από πέντε ζώα. Εάν όμως η στατιστική ισχύς είναι ανεπαρκής, ο αριθμός των ζώων θα πρέπει να αυξάνεται όσο χρειάζεται. Κατά κανόνα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται αρσενικά ζώα. Σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να δικαιολογείται η χρήση μόνο θηλυκών ζώων, λόγου χάριν κατά τον έλεγχο φαρμάκων που προορίζονται ειδικά για τις γυναίκες ή κατά τη διερεύνηση του μεταβολισμού στον οργανισμό των γυναικών. Εάν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φύλων όσον αφορά την τοξικότητα ή τον μεταβολισμό, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ζώα και των δύο φύλων.

Περίοδος χορήγησης

26. Με βάση παρατηρήσεις ότι οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται με κάθε αγωγή, είναι απαραίτητο να εφαρμόζεται ένα σχήμα επαναλαμβανόμενων δόσεων με καθημερινή χορήγηση δόσεων για 28 ημέρες. Το σχήμα αυτό θεωρείται γενικά αποδεκτό, τόσο για την επαρκή συσώρευση των μεταλλάξεων που προκαλούνται από ασθενή μεταλλαξιγόνα, όσο και για την παροχή επαρκούς χρόνου έκθεσης ώστε να ανιχνεύονται μεταλλάξεις σε όργανα των οποίων τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με αργούς ρυθμούς. Για ορισμένες αξιολογήσεις ενδέχεται να είναι κατάλληλα εναλλακτικά δοσολογικά σχήματα, τα οποία θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικά στο πρωτόκολλο. Η διάρκεια της αγωγής δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από τον χρόνο που απαιτείται για την πλήρη επαγωγή όλων των σχετικών μεταβολικών ενζύμων, ενώ συντομότερες περιόδοι αγωγής μπορεί να απαιτούν τη χρήση πολλών χρόνων δειγματοληψίας, κατάλληλων για όργανα με διαφορετικούς ρυθμούς πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όλες οι διαθέσιμες πληροφορίες (π.χ. για τη γενική τοξικότητα ή τον μεταβολισμό και τη φαρμακοκινητική) κατά την αιτιολόγηση ενός πρωτοκόλλου, ιδίως εάν προβλέπονται αποκλίσεις από τις ανωτέρω τυπικές συστάσεις. Οι περίοδοι αγωγής που υπερβαίνουν τις 8 εβδομάδες, παρόλο που ενδεχομένως αυξάνουν την ευαισθησία, θα πρέπει να επεξηγούνται σαφώς και να αιτιολογούνται, δεδομένου ότι είναι δυνατόν να προκαλέσουν φαινόμενη αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων μέσω κλωνικής επέκτασης (29).

Επίπεδα δόσης

27. Τα επίπεδα δόσεων θα πρέπει να βασίζονται στα αποτελέσματα μελέτης καθορισμού εύρους δόσεων, κατά την οποία μετράται η γενική τοξικότητα και η οποία έχει διεξαχθεί μέσω της ίδιας οδού έκθεσης, ή στα αποτελέσματα προγενέστερων μελετών υποξείας τοξικότητας. Για τον καθορισμό του εύρους δόσεων μπορούν να χρησιμοποιούνται μη διαγονιδιακά ζώα του ίδιου στελέχους τρωκτικών. Προκειμένου να ληφθούν πληροφορίες για τη σχέση δόσης-απόκρισης, μια ολοκληρωμένη μελέτη θα πρέπει να περιλαμβάνει στην κυρίως δοκιμή μια ομάδα αρνητικών μαρτύρων (βλ. παράγραφο 22) και τουλάχιστον τρία επίπεδα δόσης με κατάλληλα διαστήματα μεταξύ τους, εκτός από τις περιπτώσεις στις οποίες χρησιμοποιείται οριακή δόση (βλ. παράγραφο 28). Η ανώτατη δόση θα πρέπει να ισούται με τη μέγιστη ανεκτή δόση (ΜΑΔ). Η ΜΑΔ ορίζεται ως η δόση που προκαλεί σημεία τοξικότητας τέτοια ώστε να αναμένεται ότι υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση το ίδιο δοσολογικό σχήμα, θα επιφέρουν τον θάνατο. Χημικές ουσίες με ειδική βιολογική δράση σε χαμηλές, μη τοξικές δόσεις (όπως οι ορμόνες και τα μιτογόνα), καθώς και χημικές ουσίες που παρουσιάζουν κορεσμό των τοξικοκινητικών ιδιοτήτων, μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις των κριτηρίων καθορισμού των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Τα χρησιμοποιούμενα επίπεδα δόσης θα πρέπει να καλύπτουν την κλίμακα από τη μέγιστη μέχρι την ελάχιστη ή μηδενική τοξικότητα.

Οριακή δοκιμή

28. Εάν έχει καταδειχθεί από πειράματα καθορισμού εύρους δόσεων ή από υφιστάμενα δεδομένα για συγγενή στελέχη τρωκτικών ότι ένα δοσολογικό σχήμα που περιλαμβάνει τουλάχιστον την οριακή δόση (βλ. κατωτέρω) δεν έχει ως αποτέλεσμα παρατηρήσιμες τοξικές επιδράσεις και εάν, βάσει δεδομένων για χημικές ουσίες ανάλογης δομής, δεν αναμένεται γονιδοτοξικότητα, ενδέχεται να μην κριθεί απαραίτητη η πλήρης μελέτη με τρία επίπεδα δόσης. Η οριακή δόση για περίοδο χορήγησης 28 ημερών (δηλ. 28 ημερήσιες δόσεις) είναι 1 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, ενώ για περίοδο χορήγησης 14 ή λιγότερων ημερών, είναι 2 000 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (οι δοσολογίες που διαφέρουν από τη χορήγηση 28 ημερήσιων δόσεων θα πρέπει να αιτιολογούνται επιστημονικά στο πρωτόκολλο — βλ. παράγραφο 26).

Χορήγηση των δόσεων

29. Η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται συνήθως από το στόμα με τη χρήση στομαχικού καθετήρα ή κατάλληλης διασωλήνωσης. Γενικά, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον σχεδιασμό του προσδιορισμού η προβλεπόμενη οδός έκθεσης του ανθρώπου. Ενδέχεται επομένως να είναι αποδεκτές και άλλες οδοί έκθεσης (π.χ. μέσω του πόσιμου νερού, υποδόρια ή ενδοφλέβια ένεση, τοπική εφαρμογή, μέσω της εισπνοής, ενδοτραχειακή χορήγηση, μέσω της τροφής ή εμφύτευση), εφόσον μπορούν να αιτιολογηθούν. Η ενδοπεριτοναϊκή ένεση δεν συνιστάται, επειδή δεν αποτελεί οδό συναφή από άποψη φυσιολογίας με την έκθεση του ανθρώπου. Ο μέγιστος όγκος υγρού που μπορεί να χορηγηθεί με στομαχικό καθετήρα ή ένεση κάθε φορά εξαρτάται από το μέγεθος του πειραματόζωου και θα πρέπει να μην υπερβαίνει τα 2 ml/100 g σωματικού βάρους. Η χρήση μεγαλύτερου όγκου θα πρέπει να αιτιολογείται. Με εξαίρεση τις ερεθιστικές ή διαβρωτικές χημικές ουσίες, των οποίων οι επιδράσεις κανονικά επιδεινώνονται από τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, η μεταβλητότητα του όγκου δοκιμής θα πρέπει να ελαχιστοποιείται με ρύθμιση της συγκέντρωσης, ώστε να εξασφαλίζεται σταθερός όγκος σε όλα τα επίπεδα δόσης.

Χρόνος δειγματοληψίας

Σωματικά κύτταρα

30. Ο χρόνος δειγματοληψίας αποτελεί κρίσιμης σημασίας μεταβλητή, διότι καθορίζεται από το χρονικό διάστημα που απαιτείται για τη σταθεροποίηση των μεταλλάξεων. Το διάστημα αυτό είναι συγκεκριμένο για κάθε ιστό και φαίνεται να συνδέεται με τον χρόνο ανανέωσης του πληθυσμού των κυττάρων, καθώς ο μυελός των οστών και το έντερο αντιδρούν με ταχείς ρυθμούς, ενώ το ήπαρ με πολύ βραδύτερους. Κατάλληλη συμβιβαστική λύση για τη μέτρηση των συχνοτήτων

μεταλλάξεων σε ιστούς των οποίων τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με ταχείς και με βραδείς ρυθμούς είναι η αγωγή με 28 διαδοχικές ημερήσιες δόσεις (όπως υποδεικνύεται στην παράγραφο 26) και η λήψη δειγμάτων τρεις ημέρες μετά την τελευταία δόση. Παρόλα αυτά, η μέγιστη συχνότητα μεταλλάξεων είναι πιθανόν να μην εκδηλωθεί σε ιστούς με βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού υπό αυτές τις συνθήκες. Εάν οι ιστοί με βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού έχουν ιδιαίτερη σημασία, μπορεί να είναι σκόπιμο να μετατεθεί ο χρόνος δειγματοληψίας 28 ημέρες μετά την περίοδο χορήγησης των 28 ημερών (16) (29). Στις περιπτώσεις αυτές, ο μεταγενέστερος χρόνος δειγματοληψίας αντικαθίστα το τριήμερο διάστημα έως τη δειγματοληψία και απαιτείται επιστημονική αιτιολόγηση της επιλογής αυτής.

Γεννητικά κύτταρα

31. Οι προσδιορισμοί σε ΔΓΤ είναι ιδιαίτερος κατάλληλοι για τη μελέτη της επαγωγής γονιδιακής μετάλλαξης σε αρσενικά γεννητικά κύτταρα (7) (8) (27) με σαφώς καθορισμένους χρόνους και κινητική της σπερματογένεσης. Οι μικροί αριθμοί ωαρίων που είναι διαθέσιμα για ανάλυση, ακόμα και μετά από υπερωορρηξία, και το γεγονός ότι δεν συντίθεται DNA στο ωοκύτταρο αποκλείουν τον προσδιορισμό της μετάλλαξης θηλυκών γεννητικών κυττάρων με τη χρήση προσδιορισμών σε διαγονιδιακά ζώα (31).
32. Οι χρόνοι δειγματοληψίας για τα αρσενικά γεννητικά κύτταρα θα πρέπει να επιλέγονται κατά τρόπο ώστε, αφενός να λαμβάνονται δείγματα από όλους τους τύπους κυττάρων που εκτίθενται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων και, αφετέρου, να εκτίθεται επαρκώς το στάδιο που αποτελεί τον στόχο της δειγματοληψίας. Ο χρόνος που χρειάζεται για να εξελιχθούν τα γεννητικά κύτταρα από σπερμογονιακά βλαστοκύτταρα σε ώριμο σπέρμα που φτάνει στον σπερματικό πόρο/στην ουρά της επιδιδυμίδας είναι περίπου 49 ημέρες για τους ποντικούς (36) και περίπου 70 ημέρες για τους επίμυες (34) (35). Μετά από έκθεση 28 ημερών και παρέλευση τριήμερου διαστήματος έως τη δειγματοληψία, το συσσωρευμένο σπέρμα που συλλέγεται από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας (7) (8) αντιπροσωπεύει έναν πληθυσμό κυττάρων που έχει εκτεθεί κατά τη διάρκεια περίπου του δεύτερου μισού της σπερματογένεσης, το οποίο περιλαμβάνει τη μειωτική και τη μεταμειωτική περίοδο, όχι όμως την περίοδο των σπερμογονιακών βλαστοκυττάρων. Για να ληφθεί από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας κατάλληλο δείγμα κυττάρων που ήταν σπερμογονιακά βλαστοκύτταρα κατά τη διάρκεια της περιόδου έκθεσης, απαιτείται ένας επιπλέον χρόνος δειγματοληψίας τουλάχιστον 7 εβδομάδες (ποντικοί) ή 10 εβδομάδες (επίμυες) μετά το τέλος της αγωγής.
33. Τα κύτταρα που εξωθούνται από τα σπερματοφόρα σωληνάρια μετά την εφαρμογή σχήματος δειγματοληψίας 28 + 3 ημερών αποτελούνται από έναν μικτό πληθυσμό, εμπλουτισμένο από όλα τα στάδια των αναπτυσσόμενων γεννητικών κυττάρων (7) (8). Η δειγματοληψία αυτών των κυττάρων για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων δεν παρέχει τόσο επακριβή αξιολόγηση των σταδίων στα οποία επάγονται οι μεταλλάξεις των γεννητικών κυττάρων όσο αυτή που μπορεί να επιτευχθεί με τη δειγματοληψία σπερματοζωαρίων από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας (δεδομένου ότι τα δείγματα που λαμβάνονται από τα σωληνάρια περιέχουν διάφορους τύπους γεννητικών κυττάρων και αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός θα είναι μολυσμένος σε κάποιο βαθμό από σωματικά κύτταρα). Ωστόσο, η δειγματοληψία κυττάρων από τα σπερματοφόρα σωληνάρια, επιπλέον των σπερματοζωαρίων από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας, μόνο με ένα σχήμα δειγματοληψίας 28 + 3 ημερών καλύπτει ως ένα βαθμό τα κύτταρα που εκτίθενται κατά τη διάρκεια της πλειονότητας των σταδίων ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων και ενδέχεται να είναι χρήσιμη για την ανίχνευση ορισμένων μεταλλαξιόνων των γεννητικών κυττάρων.

Παρατηρήσεις

34. Θα πρέπει να διεξάγονται γενικές κλινικές παρατηρήσεις τουλάχιστον μια φορά ημερησίως, κατά προτίμηση την ίδια ώρα κάθε ημέρα και λαμβανόμενου υπόψη του χρόνου κορύφωσης των αναμενόμενων επιδράσεων μετά τη χορήγηση της δόσης. Η κατάσταση της υγείας των ζώων θα πρέπει να καταγράφεται. Όλα τα ζώα θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον δύο φορές ημερησίως για νοσηρότητα και θνησιμότητα και να ζυγίζονται τουλάχιστον εβδομαδιαίως και κατά τον χρόνο θανάτωσης. Η κατανάλωση τροφής θα πρέπει να μετράται τουλάχιστον εβδομαδιαίως. Εάν η ελεγχόμενη χημική ουσία χορηγείται με το πόσιμο νερό, θα πρέπει να μετράται η κατανάλωσή του σε κάθε αλλαγή νερού και, τουλάχιστον, εβδομαδιαίως. Τα ζώα που εμφανίζουν μη θανάσιμους δείκτες υπερβολικής τοξικότητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε ευθανασία πριν από την ολοκλήρωση της περιόδου δοκιμής (23).

Συλλογή ιστών

35. Θα πρέπει να καθορίζεται με σαφήνεια το σκεπτικό συλλογής ιστών. Δεδομένου ότι η επαγωγή μεταλλάξεων μπορεί να μελετηθεί σχεδόν σε οποιονδήποτε ιστό, η επιλογή των ιστών που θα συλλεχθούν θα πρέπει να βασίζεται στον λόγο διεξαγωγής της μελέτης και στα υφιστάμενα δεδομένα μεταλλαξιόγνεσης, καρκινογένεσης ή τοξικότητας για την υπό διερεύνηση χημική ουσία. Σημαντικοί παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι, μεταξύ άλλων, η οδός χορήγησης (βάσει των πιθανών οδών έκθεσης του ανθρώπου), η προβλεπόμενη κατανομή στους ιστούς και ο πιθανός μηχανισμός δράσης. Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες τεκμηρίωσης, θα πρέπει να συλλέγονται διάφοροι σωματικοί που ενδιαφέρουν, αντιπροσωπευτικοί των ιστών με ταχύ και βραδύ ρυθμό πολλαπλασιασμού, καθώς και των ιστών των θέσεων επαφής. Επιπλέον, θα πρέπει να συλλέγονται και να φυλάσσονται σπερματοζωάρια από τον σπερματικό πόρο/την ουρά της επιδιδυμίδας και αναπτυσσόμενα γεννητικά κύτταρα από τα σπερματοφόρα σωληνάρια (όπως περιγράφεται στις παραγράφους 32 και 33), για το ενδεχόμενο να απαιτηθεί στο μέλλον ανάλυση της μεταλλαξιόγνεσης στα γεννητικά κύτταρα. Θα πρέπει να μετράται το βάρος των οργάνων και, στην περίπτωση των μεγαλύτερων οργάνων, να συλλέγεται η ίδια περιοχή τους από όλα τα ζώα.

Φύλαξη ιστών και DNA

36. Οι ιστοί (ή ομοιογενοποιημένοι ιστοί) θα πρέπει να φυλάσσονται στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ή σε χαμηλότερη θερμοκρασία και να χρησιμοποιούνται για απομόνωση του DNA εντός 5 ετών. Το απομονωμένο DNA θα πρέπει να φυλάσσεται υπό μύξη στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και, ως βέλτιστη πρακτική, να χρησιμοποιείται για ανάλυση μεταλλάξεων εντός 1 έτους.

Επιλογή ιστών για ανάλυση μεταλλαγμάτων

37. Η επιλογή των ιστών θα πρέπει να βασίζεται σε κριτήρια όπως 1) η οδός χορήγησης ή η θέση πρώτης επαφής (π.χ. αδενικό τμήμα του στομάχου, σε περίπτωση χορήγησης από το στόμα, πνεύμονες, προκειμένου για χορήγηση μέσω της εισπνοής, ή επιδερμίδα, σε περίπτωση τοπικής εφαρμογής) και 2) οι φαρμακοκινητικές παράμετροι που έχουν παρατηρηθεί σε μελέτες γενικής τοξικότητας και έχουν δείξει διάθεση, κατακράτηση ή συσσώρευση σε ιστούς ή έχουν υποδείξει όργανα-στόχους της τοξικότητας. Εάν η μελέτη διεξάγεται ως συνέχεια σε μελέτες καρκινογένεσης, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ιστοί-στόχοι της καρκινογένεσης. Η επιλογή ιστών για ανάλυση θα πρέπει να μεγιστοποιεί την ανίχνευση χημικών ουσιών οι οποίες αποτελούν μεταλλαξιογόνα με άμεση δράση in vitro, μεταβολίζονται με ταχύ ρυθμό, είναι ιδιαίτερες δραστικές ή απορροφώνται ελάχιστα ή των οποίων ο ιστός-στόχος καθορίζεται από την οδό χορήγησης (6).
38. Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες τεκμηρίωσης και λαμβανομένης υπόψη της θέσης επαφής που καθορίζεται από την οδό χορήγησης, θα πρέπει να αξιολογείται η μεταλλαξιογένεση στο ήπαρ και τουλάχιστον σε έναν ταχέως διαιρούμενο ιστό (π.χ. αδενικό τμήμα του στομάχου, μυελός των οστών). Μολονότι, ως επί το πλείστον, οι ανωτέρω απαιτήσεις πληρούνται με την ανάλυση δύο προσεκτικά επιλεγμένων ιστών, σε ορισμένες περιπτώσεις ενδέχεται να χρειαστούν τρεις ή περισσότεροι ιστοί. Εάν υπάρχουν λόγοι ιδιαίτερης ανησυχίας για τις επιδράσεις στα γεννητικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των θετικών αποκρίσεων σε σωματικά κύτταρα, θα πρέπει να εξετάζονται γεννητικοί ιστοί για μεταλλάξεις.

Μέθοδοι μετρήσεων

39. Υπάρχουν τυπικές εργαστηριακές ή δημοσιευμένες μέθοδοι ανίχνευσης μεταλλαγμάτων για τα συνιστώμενα διαγονιδιακά μοντέλα: λ βακτηριοφάγοι και πλασμίδια με το γονίδιο *lacZ* (30), ποντικός με το γονίδιο *lacI* (2) (18), ποντικοί *gpt delta* (22), επίμυες *gpt delta* (28) και επιλογή ως προς το γονίδιο *cII* (17). Οι τροποποιήσεις των μεθόδων αυτών θα πρέπει να δικαιολογούνται και να τεκμηριώνονται καταλλήλως. Τα δεδομένα από πολλαπλά πακεταρίσματα μπορούν να συναρθίζονται και να χρησιμοποιούνται για την επίτευξη επαρκούς αριθμού πλακών ή αποικιών. Ωστόσο, η ανάγκη μεγάλου αριθμού αντιδράσεων πακεταρίσματος για την επίτευξη του κατάλληλου αριθμού πλακών μπορεί να αποτελεί ένδειξη κακής ποιότητας του DNA. Στις περιπτώσεις αυτές, τα δεδομένα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με επιφύλαξη, επειδή ενδέχεται να είναι αναξιόπιστα. Ο βέλτιστος συνολικός αριθμός πλακών ή αποικιών ανά δείγμα DNA διέπεται από τη στατιστική πιθανότητα ανίχνευσης επαρκών αριθμών μεταλλαγμάτων με δεδομένη συχνότητα αυτόματων μεταλλάξεων. Γενικά, εάν η συχνότητα αυτόματων μεταλλάξεων είναι της τάξης του 3×10^{-5} , απαιτούνται τουλάχιστον 125 000 έως 300 000 πλάκες (15). Για τον προσδιορισμό *lacI* με μοντέλο Big Blue®, είναι σημαντικό να καταδεικνύεται ότι μπορεί να ανιχνευθεί το πλήρες φάσμα των μεταλλαγμένων χρωματικών φαινοτύπων, με την προσθήκη κατάλληλων συντρεχόντων χρωματικών μαρτύρων σε κάθε πλάκα καλλιέργειας. Οι ιστοί και τα δείγματα που προκύπτουν (στοιχεία) θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία και ανάλυση βάσει σχεδιασμού κατά συστάδες, ο οποίος προβλέπει την ταυτόχρονη επεξεργασία στοιχείων από την ομάδα μαρτύρων με τον φορέα/διαλύτη, την ομάδα θετικών μαρτύρων (εάν χρησιμοποιείται) ή το DNA που αποτελεί θετικό μάρτυρα (κατά περίπτωση) και από κάθε ομάδα αγωγής.

ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΣΥΝΤΑΞΗ ΕΚΘΕΣΗΣ

Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

40. Θα πρέπει να παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα τα δεδομένα για κάθε ζώο. Η πειραματική μονάδα είναι το ζώο. Η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει τον συνολικό αριθμό μονάδων σχηματισμού πλάκας (rfu) ή μονάδων σχηματισμού αποικίας (cfu), τον αριθμό των μεταλλαγμάτων και τη συχνότητα μεταλλάξεων σε κάθε ιστό κάθε ζώου. Σε περίπτωση πολλαπλών αντιδράσεων πακεταρίσματος/διάσωσης, θα πρέπει να αναφέρεται ο αριθμός αντιδράσεων ανά δείγμα DNA. Παρόλο που θα πρέπει να διατηρούνται τα δεδομένα για κάθε επιμέρους αντίδραση, πρέπει να αναφέρεται μόνο ο συνολικός αριθμός rfu ή cfu. Θα πρέπει να αναφέρονται δεδομένα για την τοξικότητα και τα κλινικά σημεία σύμφωνα με την παράγραφο 34. Τα αποτελέσματα προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας θα πρέπει να παρουσιάζονται για κάθε μετάλλαγμα που αναλύθηκε, συνοδευόμενα από τους υπολογισμούς της προκύπτουσας συχνότητας μεταλλάξεων για κάθε ζώο και ιστό.

Στατιστική αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

41. Υπάρχουν διάφορα κριτήρια προσδιορισμού ενός θετικού αποτελέσματος, όπως η σχετιζόμενη με τη δόση αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων ή η σαφής αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων σε μια μόνο ομάδα δόσης σε σύγκριση με την ομάδα μαρτύρων με διαλύτη/φορέα. Προκειμένου να συγκεντρωθούν επαρκή δεδομένα για ανάλυση της σχέσης δόσης-απόκρισης, θα πρέπει να αναλύονται τουλάχιστον τρεις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν δόσεις. Παρόλο που πρωταρχικό μέλημα θα πρέπει να είναι η βιολογική σημασία των αποτελεσμάτων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες στατιστικές μέθοδοι ως βοήθημα για την αξιολόγησή τους (4) (14) (15) (25) (26). Η πειραματική μονάδα στις χρησιμοποιούμενες στατιστικές δοκιμασίες θα πρέπει να είναι το ζώο.

42. Εάν τα αποτελέσματα για την ελεγχόμενη χημική ουσία δεν πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια σε κανέναν ιστό, η ουσία θεωρείται μη μεταλλαξιογόνος στον παρόντα προσδιορισμό. Για να κριθεί η βιολογική σημασία των αρνητικών αποτελεσμάτων, θα πρέπει να επιβεβαιώνεται η έκθεση του ιστού.
43. Όσον αφορά τις αναλύσεις προσδιορισμού της αλληλουχίας του DNA, υπάρχουν στατιστικές προσεγγίσεις που υποβοηθούν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (1) (5) (9) (19).
44. Αν εξεταστεί το κατά πόσον οι παρατηρούμενες τιμές περικλείονται στο ιστορικό πεδίο τιμών για τους μάρτυρες, είναι δυνατόν να προκύψουν κατευθύνσεις για την αξιολόγηση της βιολογικής σημασιμότητας της απόκρισης (32).

Έκθεση δοκιμής

45. Η έκθεση της δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Ελεγχόμενη χημική ουσία:

- ταυτότητα και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστός·
- προέλευση, αριθμός παρτίδας, εάν είναι διαθέσιμος·
- φυσική μορφή και καθαρότητα·
- φυσικοχημικές ιδιότητες που έχουν σημασία για τη διεξαγωγή της μελέτης·
- σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας, εάν είναι γνωστή·

Διαλύτης/φορέας:

- αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα·
- διαλυτότητα και σταθερότητα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στον διαλύτη/φορέα, εάν είναι γνωστές·
- παρασκευάσματα για χορήγηση μέσω της τροφής, του πόσιμου νερού ή της εισπνοής·
- αναλυτικοί προσδιορισμοί στα παρασκευάσματα (π.χ. σταθερότητα, ομοιογένεια, ονομαστικές συγκεντρώσεις).

Πειραματόζωα:

- είδος/στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε και αιτιολόγηση της επιλογής του·
- αριθμός, ηλικία και φύλο των ζώων·
- προέλευση, συνθήκες στέγασης, διατροφή, κ.λπ·
- ατομικό βάρος των ζώων κατά την έναρξη της δοκιμής, συμπεριλαμβανομένων του εύρους τιμών, της μέσης τιμής και της τυπικής απόκλισης για κάθε ομάδα.

Συνθήκες δοκιμής:

- δεδομένα για τους θετικούς και τους αρνητικούς (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες·
- δεδομένα από τη μελέτη καθορισμού εύρους·
- αιτιολόγηση της επιλογής των επιπέδων δόσης·
- λεπτομέρειες για το παρασκεύασμα της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας·
- αιτιολόγηση της επιλογής της οδού χορήγησης·
- μέθοδοι μέτρησης της τοξικότητας στα ζώα, συμπεριλαμβανομένων, εάν είναι διαθέσιμες, ιστοπαθολογικών ή αιματολογικών αναλύσεων και της συχνότητας με την οποία πραγματοποιήθηκαν παρατηρήσεις ή μετρήθηκε το σωματικό βάρος των ζώων·
- μέθοδοι με τις οποίες εξακριβώθηκε ότι η ελεγχόμενη χημική ουσία έφτασε στον ιστό-στόχο ή εισήλθε στη συστηματική (μεγάλη) κυκλοφορία του αίματος, εάν τα αποτελέσματα του προσδιορισμού ήταν αρνητικά·
- πραγματική δόση (mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα), υπολογιζόμενη από τη συγκέντρωση της ελεγχόμενης χημικής ουσίας στο σιτηρέσιο/στο πόσιμο νερό (ppm) και την κατανάλωση, εφόσον έχει υπολογιστεί·
- λεπτομέρειες σχετικά με την ποιότητα της τροφής και του νερού·
- λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας και αιτιολόγηση των επιλογών·

- μέθοδος ευθανασίας·
- διαδικασίες απομόνωσης και διατήρησης των ιστών·
- μέθοδοι απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA των τρωκτικών, διάσωσης του διαγονιδίου από το γονιδιωματικό DNA και μεταφοράς του διαγονιδιωματικού DNA σε βακτηριακό ξενιστή·
- προέλευση και αριθμοί παρτίδας όλων των κυττάρων, των συνόλων έτοιμων αντιδραστηρίων (κιτ) και των αντιδραστηρίων (κατά περίπτωση)·
- μέθοδοι αρίθμησης των μεταλλαγμάτων·
- μέθοδοι μοριακής ανάλυσης των μεταλλαγμάτων και χρήση για τη διόρθωση ως προς την κλωνικότητα και/ή τον υπολογισμό των συχνοτήτων μεταλλάξεων, κατά περίπτωση.

Αποτελέσματα:

- κατάσταση των ζώων πριν από την περίοδο δοκιμής και καθ' όλη τη διάρκειά της, συμπεριλαμβανομένων των σημείων τοξικότητας·
- βάρος σώματος και οργάνων κατά τη θανάτωση·
- για κάθε ιστό/ζώο, αριθμός μεταλλαγμάτων, αριθμός πλακών ή αποικιών που αξιολογήθηκαν, συχνότητα μεταλλάξεων·
- για κάθε ομάδα ιστών/ζώων, αριθμός αντιδράσεων πακεταρίσματος ανά δείγμα DNA, συνολικός αριθμός μεταλλαγμάτων, μέση συχνότητα μεταλλάξεων, τυπική απόκλιση·
- σχέση δόσης-απόκρισης, κατά το δυνατόν·
- για κάθε ιστό/ζώο, αριθμός ανεξάρτητων μεταλλαγμάτων και μέση συχνότητα μεταλλάξεων, εφόσον διενεργήθηκε μοριακή ανάλυση των μεταλλάξεων·
- δεδομένα για συντρέχοντες και ιστορικούς αρνητικούς μάρτυρες, με πεδία τιμών, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις·
- δεδομένα για συντρέχοντες θετικούς μάρτυρες (ή για DNA ως μη συντρέχοντα θετικό μάρτυρα)·
- αναλυτικοί προσδιορισμοί, εάν είναι διαθέσιμοι (π.χ. συγκεντρώσεις DNA που χρησιμοποιήθηκαν στο πακετάρισμα, δεδομένα προσδιορισμού της αλληλουχίας DNA)·
- στατιστικές αναλύσεις και εφαρμοσθείσες μέθοδοι.

Συζήτηση των αποτελεσμάτων

Συμπέρασμα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), "Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra", *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.
- (2) Bielas, J.H. (2002), "A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement", *Mutation Res.*, 518: 107-112.
- (3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), "Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations" *Nature*, 377(6550): 657-659
- (4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), "Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246-255.
- (5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), "Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency", *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405-413.
- (6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), "Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens", *Mutagenesis*, 14(1): 141-151.
- (7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper (1995), "Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.

- (8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), "Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells", *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.
- (9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), "Bayesian Analysis of Mutational Spectra", *Genetics*, 156: 1411-1418.
- (10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg (1989), "Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971-7975.
- (11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), "A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host", *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- (12) Erikson, R.P. (2003), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer", *Mutation Res.*, 543: 125-136.
- (13) Erikson, R.P. (2010), "Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update", *Mutation Res.*, **705: 96-106**.
- (14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), "Statistical Analysis of lacZ Mutant Frequency Data from Muta™ Mouse Mutagenicity Assays", *Mutagenesis*, 13(3): 249-255.
- (15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R. Tindall and N. Yajima (2000), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.
- (16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), "Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.
- (17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), "Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.
- (18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), "The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing", *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212-218.
- (19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), "Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis", *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.
- (20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), "A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi⁻ and 6-thioguanine Selections", *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465-470.
- (21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), "Spi⁻ Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice", *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9-15.
- (22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), "Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays", *Mutation Res.*, 455(1-2): 191-215.
- (23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- (25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), "Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay", *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231-245.
- (26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), "Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study", *Mutation Res.*, 388(2-3): 249-289.
- (27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), "Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays", *Mutation Res.*, 598: 164-193.

- (28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), "Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers", *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
 - (29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), "In vivo Transgenic Mutation Assays", *Mutation Res.*, 540: 141-151.
 - (30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), "Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations in vivo" in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391-410.
 - (31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), "A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells", *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
 - (32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), "Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data", *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
 - (33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
 - (34) Clermont, Y. (1972), "Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal". *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
 - (35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), "The Epididymis", in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.
 - (36) Russell, L.B. (2004), "Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse", *Genetica*, 122: 25-36.
-

Προσάρτημα

ΟΡΙΣΜΟΙ

Περίοδος χορήγησης: η συνολική περίοδος κατά την οποία χορηγούνται δόσεις σε ένα ζώο.

Υποκατάσταση ζεύγους βάσεων: ένα είδος μετάλλαξης που προκαλεί την αντικατάσταση μιας μεμονωμένης βάσης νουκλεοτιδίων DNA από άλλη βάση νουκλεοτιδίων DNA.

Καψίδιο: το πρωτεϊνικό περίβλημα ιικού σωματιδίου.

Χημική ουσία: μια ουσία ή ένα μείγμα.

Κλωνική επέκταση: η παραγωγή πολλών κυττάρων από ένα και μόνο (μεταλλαγμένο) κύτταρο.

Μονάδα σχηματισμού αποικιών (cfu): μέτρο των αριθμών βιώσιμων βακτηρίων.

Συγκαταμερές: ένα μακρύ συνεχές βιομόριο που αποτελείται από πολλαπλά πανομοιότυπα αντίγραφα συνδεδεμένα εν σειρά.

Θέση cos: τμήμα μονόκλωνου DNA, αποτελούμενο από 12 νουκλεοτιδία, που υπάρχει και στα δύο άκρα του δίκλωνου γονιδιώματος του βακτηριοφάγου λ.

Έλλειψη: μετάλλαξη που συνίσταται στην απώλεια ενός ή περισσότερων (διαδοχικών) νουκλεοτιδίων από το γονίδιομα.

Ηλεκτροπόρωση: η εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών για την αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών.

Ενδογενές γονίδιο: φυσικό γονίδιο του γονιδιώματος.

Εξωδιωνυμική μεταβλητότητα (extrabinomial variation): μεταβλητότητα των επαναλαμβανόμενων εκτιμήσεων ενός ποσοστού πληθυσμού μεγαλύτερη από εκείνη που θα αναμενόταν εάν η κατανομή του πληθυσμού ήταν διωνυμική.

Μετάλλαξη αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης: γενετική μετάλλαξη προκαλούμενη από παρεμβολές ή ελλείψεις ενός αριθμού νουκλεοτιδίων που δεν διαιρείται ακριβώς δια του τρία, σε αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη/ένα πεπτιδιο.

Παρεμβολή: η προσθήκη ενός ή περισσότερων ζευγών βάσεων νουκλεοτιδίων σε αλληλουχία DNA.

Jackpot: μεγάλος αριθμός μεταλλαγμάτων που έχουν προκύψει μέσω κλωνικής επέκτασης από μια και μόνο μετάλλαξη.

Μεγάλες ελλείψεις: ελλείψεις περισσότερων από αρκετές χιλιάδες βάσεις του DNA (οι οποίες ανιχνεύονται αποτελεσματικά με τους προσδιορισμούς επιλογής *S_{pi}* — και πλασμιδίων *lacZ*).

Συνένωση: η ομοιοπολική σύνδεση δύο άκρων μορίων DNA με τη χρήση DNA λιγάσης.

Μιτογόνο: χημική ουσία που διεγείρει ένα κύτταρο με αποτέλεσμα να αρχίσει αυτό να διαιρείται, ενεργοποιώντας τη μίτωση (ήτοι, την κυτταρική διαίρεση).

Ουδέτερο γονίδιο: γονίδιο που δεν επηρεάζεται από θετικές ή αρνητικές επιλεκτικές πιέσεις.

Πακετάρισμα (συσπείρωση): η σύνθεση μολυσματικών σωματιδίων φάγων από ένα παρασκεύασμα πρωτεϊνών καψιδίου και ουράς φάγου και ένα συγκαταμερές μορίων DNA φάγου. Χρησιμοποιείται συνήθως για το πακετάρισμα κλωνοποιημένου σε φορέα λ DNA (χωριζόμενου από θέσεις *cos*) σε μολυσματικά σωματίδια λ.

Απόδοση πακεταρίσματος: η απόδοση με την οποία οι πακεταρισμένοι βακτηριοφάγοι ανακτώνται στα βακτήρια-ξενιστές.

Μονάδα σχηματισμού πλάκας (pfu): μέτρο του αριθμού των βιώσιμων βακτηριοφάγων.

Σημιακή μετάλλαξη: γενικός όρος που χρησιμοποιείται για μεταλλάξεις οι οποίες προσβάλλουν μόνο μια μικρή αλληλουχία DNA, συμπεριλαμβανομένων μικρών παρεμβολών, ελλείψεων και υποκαταστάσεων ζευγών βάσεων.

Θετική επιλογή: μέθοδος που επιτρέπει την επιβίωση μόνο των μεταλλαγμάτων.

Γονίδιο αναφοράς: μεταλλαγμένο γονίδιο του οποίου το προϊόν είναι εύκολα ανιχνεύσιμο.

Χρόνος δειγματοληψίας: το τέλος της χρονικής περιόδου, πριν από τη θανάτωση, κατά την οποία δεν χορηγείται η χημική ουσία και οι μη επιδιορθωμένες βλάβες του DNA σταθεροποιούνται σε σταθερές μεταλλάξεις.

Αναπαραγόμενος φορέας: φορέας κατασκευασμένος έτσι ώστε να μπορεί να πολλαπλασιάζεται σε δύο διαφορετικά είδη ξενιστή· αντιστοίχως, το DNA που παρεμβάλλεται σε έναν αναπαραγόμενο φορέα μπορεί να υποβληθεί σε δοκιμή ή χειρισμούς σε δύο διαφορετικά είδη κυττάρων ή δύο διαφορετικούς οργανισμούς.

Ελεγχόμενη χημική ουσία: κάθε ουσία ή μείγμα που υποβάλλεται σε δοκιμή με τη χρήση της παρούσας μεθόδου δοκιμών.

Διαγονιδιακός: που ανήκει σε οργανισμό, σχετίζεται με οργανισμό ή είναι οργανισμός του οποίου το γονιδίωμα έχει τροποποιηθεί με τη μεταφορά ενός ή περισσότερων γονιδίων από άλλα είδη.»
