

Επίσημη Εφημερίδα

των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων

Έκδοση
στην ελληνική γλώσσα

Νομοθεσία

Περιεχόμενα

I Πράξεις για την ισχύ των οποίων απαιτείται δημοσίευση

- ★ Οδηγία 2000/32/ΕΚ της Επιτροπής, της 19ης Μαΐου 2000, σχετικά με την προσαρμογή, για εικοστή έκτη φορά, στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών⁽¹⁾ 1
- ★ Οδηγία 2000/33/ΕΚ της Επιτροπής, της 25ης Απριλίου 2000, σχετικά με την προσαρμογή, για εικοστή έβδομη φορά, στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών⁽¹⁾ 90

II Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση

Επιτροπή

2000/368/ΕΚ:

- ★ Απόφαση της Επιτροπής, της 19ης Μαΐου 2000, για διόρθωση της οδηγίας 98/98/ΕΚ σχετικά με την προσαρμογή, για εικοστή πέμπτη φορά, στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών⁽¹⁾ [κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό E(2000) 1333] 108

Τιμή: 24,50 EUR

⁽¹⁾ Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ.

EL

Οι πράξεις οι τίτλοι των οποίων έχουν τυπωθεί με ημίμαυρα στοιχεία αποτελούν πράξεις τρεχούσης διαχείρισεως που έχουν θεσπισθεί στο πλαίσιο της γεωργικής πολιτικής και είναι γενικά περιορισμένης χρονικής ισχύος.

Οι τίτλοι όλων των υπολοίπων πράξεων έχουν τυπωθεί με μαύρα στοιχεία και επισημαινονται με αστερίσκο.

I

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων απαιτείται δημοσίευση)

ΟΔΗΓΙΑ 2000/32/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 19ης Μαΐου 2000

σχετικά με για την προσαρμογή, για εικοστή έκτη φορά, στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών(*)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 27ης Ιουνίου 1967, περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 1999/33/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽²⁾, και ιδίως το άρθρο 28,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Το παράρτημα I της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ περιέχει κατάλογο επικίνδυνων ουσιών, μαζί με τα χαρακτηριστικά των διαδικασιών ταξινόμησης και επισήμανσης ως προς εκάστη ουσία. Οι σημερινές επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις έδειξαν ότι επιβάλλεται να προσαρμοστεί ο κατάλογος των επικίνδυνων ουσιών του εν λόγω παραρτήματος. Σε ορισμένες εκδόσεις της οδηγίας στις διάφορες γλώσσες απαιτούνται διορθώσεις σε συγκεκριμένα τμήματα του προλόγου και του πίνακα Α του παραρτήματος I.
- (2) Το παράρτημα III της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ περιέχει κατάλογο φράσεων που υποδηλώνουν τον χαρακτήρα των ειδικών κινδύνων που σχετίζονται με τις επικίνδυνες ουσίες και τα παρασκευάσματα. Το παράρτημα IV της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ περιέχει κατάλογο των φράσεων με συμβουλές ασφαλούς χρήσης για επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα. Στο παράρτημα VI της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ περιλαμβάνεται οδηγός για την ταξινόμηση και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών και παρασκευασμάτων. Σε ορισμένες εκδόσεις της οδηγίας στις διάφορες γλώσσες απαιτούνται διορθώσεις σε συγκεκριμένα τμήματα των παραρτημάτων III, IV και VI.
- (3) Στο παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ εμφανίζονται οι μέθοδοι προσδιορισμού των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας ουσιών και παρασκευασμάτων. Είναι ανάγκη να προσαρμοστεί το παράρτημα αυτό στην τεχνική πρόοδο.

- (4) Το παράρτημα IX της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ περιέχει τις διατάξεις περί των συστημάτων κλεισίματος ασφαλείας για τα παιδιά. Οι εν λόγω διατάξεις επιβάλλεται να προσαρμοστούν στα σύγχρονα δεδομένα. Είναι ανάγκη να επεκταθεί το πεδίο εφαρμογής της χρήσης συστημάτων κλεισίματος ασφαλείας για τα παιδιά.
- (5) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο των οδηγιών οι οποίες αποβλέπουν στην εξάλειψη των τεχνικών εμποδίων στις συναλλαγές, στον τομέα των επικίνδυνων ουσιών και παρασκευασμάτων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Άρθρο 1

Η οδηγία 67/548/ΕΟΚ τροποποιείται ως εξής:

1. Το παράρτημα I τροποποιείται ως εξής:
 - α) η σημείωση Q στο παράρτημα 1Α της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά την αντίστοιχη σημείωση στον πρόλογο·
 - β) οι σειρές στο παράρτημα 1Β της παρούσας οδηγίας αντικαθιστούν τις αντίστοιχες σειρές στον πίνακα Α·
 - γ) οι καταχωρήσεις του παραρτήματος 1Γ της παρούσας οδηγίας αντικαθιστούν τις αντίστοιχες καταχωρήσεις·
 - δ) προστίθενται οι καταχωρήσεις του παραρτήματος 1Δ της παρούσας οδηγίας.
2. Η φράση κινδύνου του παραρτήματος 2 της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά την αντίστοιχη φράση στο παράρτημα III.
3. Το παράρτημα IV τροποποιείται ως εξής:
 - α) οι φράσεις ασφαλούς χρήσης του παραρτήματος 3Α της παρούσας οδηγίας αντικαθιστούν τις αντίστοιχες φράσεις του παραρτήματος IV·

(*) Εκδόθηκε μετά την εικοστή έβδομη προσαρμογή.

⁽¹⁾ ΕΕ 196 της 16.8.1967, σ. 1.⁽²⁾ ΕΕ L 199 της 30.7.1999, σ. 57.

- β) οι συνδυασμένες φράσεις ασφαλούς χρήσης του παραρτήματος 3B της παρούσας οδηγίας αντικαθιστούν τις αντίστοιχες φράσεις του παραρτήματος IV.
4. Το μέρος Β του παραρτήματος V τροποποιείται ως εξής:
- α) το κείμενο του παραρτήματος 4Α της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά το κεφάλαιο Β.10·
- β) το κείμενο του παραρτήματος 4Β της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά το κεφάλαιο Β.11·
- γ) το κείμενο του παραρτήματος 4Γ της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά το κεφάλαιο Β.12·
- δ) το κείμενο του παραρτήματος 4Δ της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά τα κεφάλαια Β.13 και Β.14·
- ε) το κείμενο του παραρτήματος 4Ε της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά το κεφάλαιο Β.17·
- στ) το κείμενο του παραρτήματος 4ΣΤ της παρούσας οδηγίας αντικαθιστά το κεφάλαιο Β.23. Αλλάζει αντιστοίχως ο τίτλος του κεφαλαίου Β.23 στην επεξηγηματική σημείωση·
- ζ) προστίθεται το κείμενο του παραρτήματος 4Ζ της παρούσας οδηγίας.
5. Διαγράφεται η τέταρτη περίπτωση της γενικής εισαγωγής στο μέρος Γ του παραρτήματος V.
6. Τα κείμενα του παραρτήματος 5 της παρούσας οδηγίας αντικαθιστούν τα αντίστοιχα κείμενα του παραρτήματος VI.
7. Το παράρτημα ΙΧ τροποποιείται όπως καθορίζεται στο παράρτημα 6 της παρούσας οδηγίας.

Άρθρο 2

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις αναγκαίες νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις προκειμένου να συμμορφωθούν με την παρούσα οδηγία το αργότερο έως την 1η Ιουνίου 2001. Ενημερώνουν αμέσως την Επιτροπή σχετικά.

Όταν τα κράτη μέλη θεσπίζουν τις εν λόγω διατάξεις, οι τελευταίες αυτές περιέχουν παραπομπή στην παρούσα οδηγία ή συνοδεύονται από παρόμοια παραπομπή κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Ο τρόπος της παραπομπής καθορίζεται από τα κράτη μέλη.

2. Τα κράτη μέλη κοινοποιούν στην Επιτροπή τις κύριες διατάξεις της εθνικής νομοθεσίας που εγκρίνουν στον τομέα που καλύπτει η παρούσα οδηγία, καθώς και πίνακα αντιστοιχίας μεταξύ της παρούσας οδηγίας και των εγκεκριμένων εθνικών διατάξεων.

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 19 Μαΐου 2000.

Για την Επιτροπή
Margot WALLSTRÖM
Μέλος της Επιτροπής

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1Α

ΠΡΟΛΟΓΟΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΟΣ Ι

Επεξήγηση των σημειώσεων σχετικά με την ταυτοποίηση, ταξινόμηση και επισήμανση ουσιών

DA:

Note Q:

Klassificeringen som kræftfremkaldende kan udelades for fibre, som opfylder en af følgende betingelser:

- en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 10 dage
- en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 µm, har en vægtet halveringstid på mindre end 40 dage
- en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller
- en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Note Q:

Ämnet behöver inte klassificeras som cancerframkallande om det kan visas att det uppfyller ett av följande villkor:

- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar
- ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 µm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar
- ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet
- frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά την DE γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά την FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά την FI γλώσσα)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1B

ΠΙΝΑΚΑΣ Α

Z	Symb.	ES	DA	DE	EL	EN	FI	FR	IT	NL	PT	SV
«18	Ar	Argón	Argon	Argon	Αργό	Argon	Argon	Argon	Argon	Argon	Άργον	Argon»
«64	Gd	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinium	Γαδολίνιο	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium	Gadolinio	Gadolinium»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΓ

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισημωση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρά-οικουσιμα
006-011-00-7	Carbaryl (ISO) Μεθυλοκαρβαμικό 1-ναφθύλιο		200-555-0	63-25-2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-)22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	Metam-sodium (ISO) Μετάν-νάτριο N-μεθυλοδιεοκαρβαμικό νάτριο		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	Diuron (ISO) 3-(3,4-διχλωροφαινόλο)-1,1-διμεθυλοουρία		206-354-4	330-54-1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	Propoxur (ISO) N-μεθυλοκαρβαμικός 2-ισοπροπόξυφαινυλεστέρας		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-017-00-X	Aldicarb (ISO) 2-μεθυλο-2-(μεθυλοθειο)προπιοναλδεΐδο-Ο- (μεθυλοκαρβαμυλ)οξείμη		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	Aminocarb (ISO) Μεθυλοκαρβαμικό 4-διμεθυλαμινο-3-τολυλο		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	di-allate (ISO) N,N-διισοπροπυλοθειοκαρβαμικός S-2,3-δισωραλκυλεστέρας		218-961-1	2303-16-4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
006-020-00-6	Barban (ISO) N-(3-χλωροφαινοκαρβαμικός) 4-χλωροβουτ-2-υλεστέρας		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		
006-023-00-2	Mercaptodimethur (ISO) Μεθυλοκαρβαμικός 4-μεθυλοθειο-3,5-ξυλεστέρας		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-37-45-60-61		
006-024-00-8	Proxan-sodium (ISO) Ο-ισοπροπυλοδιεοκαρβαμικό νάτριο		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισημωση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρά-σκευάσματα
006-026-00-9	Carbofuran (ISO) Μεθυλοκαρβαμικός 2,3-διϋδρο-2,2-βιμεθυλοβενζοφουραν-7-υλεστέρας		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	Dinobuton (ISO) Ανθρακικός 2-δευτ.-βουτυλο-4,6-δινιτροφαιλυ-ισοπροπυλεστέρας		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)37-45-60-61		
006-029-00-5	Dioacarb (ISO) N-μεθυλοκαρβαμικός 2-(1,3-διοξολαν-2-υλ)φαιλυλεστέρας		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2)37-45-61		
006-033-00-7	Μετοξουρόν (ISO) 3-(3-χλωρο-4-μεθοξυφαιλυο)-1,1-διμεθυλουρία		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	Pebutate (ISO) (Αιθυλο)βουτυλοθειοκαρβαμικός S-προπυλεστέρας		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2)23-61		
006-035-00-8	Primicarb (ISO) N,N-διμεθυλοκαρβαμικός 2- διμεθυλαμινο-5,6-διμεθυλοπιριμιδιν-4-υλεστέρας		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	Promecarb (ISO) Μεθυλοκαρβαμικός 5-ισοπροπυλο-3-τολουλεστέρας		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	Sulfalate (ISO) Διμεθυλοδιθειοκαρβαμικός 2-χλωροαιλυλεστέρας	E	202-388-9	95-06-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	Tri-allyate (ISO) Δισοπροπυλοθειοκαρβαμικός S-2,3,3-τριχλωροαιλυλεστέρας		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2)24-37-60-61		
006-042-00-6	Monuron (ISO) 3-(4-χλωροφαιλυο)-1,1-διμεθυλουρία		205-766-1	150-68-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		
006-043-00-1	Monuron-TCA Τριχλωροεϊκό 3-(4-χλωροφαιλυο)-1,1-διμεθυλουρόνιο		—	140-41-0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2)36/37-60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικά με παρασκευάσματα
006-045-00-2	Methomyl (ISO) Μεθυλοκαρβαμικόλη 1-μεθυλοθειοαιθυλδεναμίνη		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	Bendiocarb (ISO) Μεθυλοκαρβαμικός 2,2-διμεθυλο-1,3-βενζοδιοξολ-4-υλεστέρας		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	Bufencarb (ISO) Μείγμα των: μεθυλοκαρβαμικός 3-(1-μεθυλοβου- τυλο)φαινυλεστέρας και μεθυλοκαρβαμικός 3-(1-αυλοσπορτυλο)φαινυλεστέρας (3:1)		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	Ethiofencarb (ISO) Μεθυλοκαρβαμικός 2-αυλοθειομεθυλοφαινυλεστέρας		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
006-050-00-X	Feniton-TCA Τριχλωροεπικό 1,1-διμεθυλο-3-φαινυλουρόνιο		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-60-61		
006-053-00-6	Isoprocarb (ISO) Μεθυλοκαρβαμικός ο-κουμυλεστέρας		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
006-054-00-1	Mexacarbate (ISO) Μεθυλοκαρβαμικός 4-διμεθυλαμινο-3,5-ξυλεστέρας		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
006-057-00-8	Nitpargrin (ISO) 2-χλωρο-6-τριχλωρομεθυλοπυριδίνη		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-24-61		
006-060-00-4	4,4-διοξείδιο-2-μεθυλο-5,6-διδυδρο-1,4-οξείδιο- 3-καρβοξυανιλίδιο		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-61		
006-069-00-3	Thiophanate-methyl (ISO) 4,4'-(Ο-φαινυλενο)δισ(3-θειοαλλοφαινικό)μεθύλιο		245-750-7	23564-05-8	Muta. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-36/37-60-61		
006-070-00-9	Furmecycloz N-κυκλοξυλο-N-μεθοξυ-2,5-διμεθυλο- 3-φουραμίδιο		262-302-0	60568-05-0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-36/37-60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παράσκευασματα
006-088-00-7	Benfurocarb (ISO) N-[2,3-διεϋδρο-2,2-διμεθυλοβενζοφουρανο-7-υλοξυκαρβονυλ(μεθυλ)αμινοϋξείο]-N-ισοπροπυλο-β-αλανινικό αθώλιο		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
007-012-00-5	N,N-διμεθυλυδραζίνη 1,1-διμεθυλυδραζίνη	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	N,N'-διμεθυλυδραζίνη 1,2-διμεθυλυδραζίνη	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25%: T; R45-23/24/25 3% ≤ C < 25%: T; R45-20/21/22 0,01% ≤ C < 3%: T; R45	
009-003-00-1	Υδροφορικό οξύ ... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-7)9-26-36/37-45	C ≥ 7%: T+; C; R26/27/28-35 1% ≤ C < 7%: T; R23/24/25-34 0,1% ≤ C < 1%: Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	Azinphos-methyl (ISO) Διθεοφοφορικός Ο,Ο-διμεθυλο-4-οξοβενζοτριαιζίν-3-υλμεθυλεστέρας		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	Fenthion (ISO) Θεοφοφορικός Ο,Ο-διμεθυλ-Ο-(4-μεθυλοϋξείο-μ-τολυλεστέρας		200-231-9	55-38-9	Muta. Cat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
015-056-00-1	Azinphos-ethyl (ISO) Διθεοφοφορικός Ο,Ο-διαθυλο-4-οξοβενζοτριαιζίν-3-υλμεθυλεστέρας		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	Triazophos (ISO) Θεοφοφορικό Ο,Ο-διαθυλο-Ο-1-φαινυλο-1H,2,4-τριαζολ-3-ύλιο		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
016-013-00-X	Δηλωρίδιο του θείου Δηλωρίδιο του θείου		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικά με παρασκευάσματα
016-014-00-5	Τετραχλωριούχο θείο		—	13451-08-6	R14 C: R34 N: R50	C: N R: 14-34-50 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi: R36/37/38	
016-023-00-4	Θειικός διμεθυλεστέρας	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C: R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25%: T+; R45-25-26-34-43 10% ≤ C < 25%: T+; R45-22-26-34-43 7% ≤ C < 10%: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5% ≤ C < 7%: T; R45-22-23-36/37/38-43 3% ≤ C < 5%: T; R45-22-23-43 1% ≤ C < 3%: T; R45-23-43 0.1% ≤ C < 1%: T; R45-20 0,01% ≤ C < 0,1%: T; R45	
016-024-00-X	Dimexano (ISO) Δις(μεθοξυβενζοκαρβονούλο)δισουλφίδιο		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N: R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
016-071-00-6	3-αμινο-6,13-δωλωρο-10-((3-((4-χλωρο-6-(2-σουλφοφωστανυλαμινο)-1,3,5-τριάζιν-2-υλο)αμινο)προπυλο)αμινο)-4,11-τριφαινοξιδιοξαζινο δισουλφονικό τρινάτριο		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
022-001-00-5	Τετραχλωριούχο πτάνιο		231-441-9	7550-45-0	R14 C: R34	C R: 14-34 S: (1/2)-7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10%: C: R34 5% ≤ C < 10%: Xi: R36/37/38	
030-004-00-8	Διμεθυλομειδάργυρος [1] Διαβιλομειδάργυρος [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F: R17 C: R34 N: R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2)-16-43-45-60-61		
050-002-00-0	Κυεξάτινη (ISO) Υδροξυτρικυκλοξέλυλοκασσατεράνιο		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N: R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-13-60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρά-σκευάσματα
050-012-00-5	Τετρακυκλοεξυλοκασσιτεράνιο [1] Χλωροπικολοεξυλοκασσιτεράνιο [2] Βουτυλοπικολοεξυλοκασσιτεράνιο [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-26-28-60-61	C ≥ 1%; Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	Οξείδιο του δια(τρις(2-μεθυλο-2-φαινυλοπροπυλο)κασσιτέρου)		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2)-28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	Θειοχρωμικού μολύβδου, κίτρινο CI Pigment Yellow 34 (Αυτή η ουσία ταυτοποιείται στο Colour Index με τον αριθμό CI 77603)		215-693-7	1344-37-2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	Θεικού μολύβδανικού χρωμικού μολύβδου ερυθρό CI Pigment Red 104 (Αυτή η ουσία ταυτοποιείται στο Colour Index με τον αριθμό CI 77605)		235-759-9	12656-85-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	Κουμένιο [1] Προπυλοβενζόλιο [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2)-24-37-61-62		4
601-032-00-3	Βενζο[α]πυρένιο Βενζο[def]χρυσένιο		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	Βενζο[ε]αιεφανανθράκενιο		205-911-9	205-99-2	Carc. Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-διχλωροβενζόλιο p-διχλωροβενζόλιο		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2)-24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-ωδοπυρένιο αλλυλοϊωδίδιο		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2)-7-26-45		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικά με παρασκευάσματα
603-076-00-9	Βουτ-2-νο-1,4-διόλη		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2)-26-36/37/39-45	C ≥ 50%: T; R21-23/25-34-48/22 25% ≤ C < 50%: T; R21-23/25-36/38-48/22 10% ≤ C < 25%: Xn; R20/22-48/22 3% ≤ C < 10%: Xn; R20/22	
603-091-00-0	Εξω-4-ισοπροπυλο-1-μεθυλ-1,4-εποξυκυκλοεξάν-2-όλη		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2)-26		
603-093-00-1	Εξω-(+)-1-μεθυλο-2-(2-μεθυλοβενζυλοξυ)-4-ισοπροπυλο-7-οξείδιο [2.2.1]επτάνιο		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2)-23-61		
603-097-00-3	1,1',1"-νιτρωστριπροταν-2-όλη		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2)-26-61		
603-117-00-0	Προταν-2-όλη Ισοπροπυλική αλκοόλη		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2)-7-16-24/25-26		6
604-020-00-6	Διφαινυλ-2-όλη 2-υδροξυδιφαινύλιο		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2)-22-61		
604-021-00-1	Διφαινυλ-2-υλικό νάτριο		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2)-22-26-61		
604-024-00-8	4,4'-ισοβουτυλαθυλοδιενοδιφαινόλη		401-720-1	6807-17-6	Repr. Cat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	5-[2-χλωρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινόξυ]-2-νιτροβενζοϊκό οξύ [1] 5-[2-χλωρο-4-(τριφθορομεθυλο)φαινόξυ]-2-νιτροβενζοϊκό νάτριο [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2)-24-39-60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρά-σκευάσματα
604-043-00-1	Μονοβενζίνη 4-υδροξυφαινόλο-βενζυλαυθέρας		203-083-3	103-16-2	Xi: R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	Μεκανόλη 4-μεθοξυφαινόλη		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi: R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	Γλυοξάλη ... %	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi: R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-)36/37	C ≥ 10%: Xn; R20-36/38-40-43 1% ≤ C < 10%: Xn; R40-43	
606-016-00-X	Pindone (ISO) 2-πυβαλοτυλινδαν-1,3-διόνη		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
606-018-00-0	Dichlone (ISO) 2,3-δυχλωρο-1,4-ναφθοκινόνη		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi: R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-60-61		
606-019-00-6	Chlordecone (ISO) Δεκαχλωροστεντακταίο[5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8}]δεκαν-4- όνη		205-601-3	143-50-0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	Metribuzin (ISO) 4-αμνο-6-τετ-βουτυλο-3-μεθυλδιο-1,2,4-τριαζίν-5- (4H)-όνη		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-035-00-3	Chloridazon (ISO) 5-αμνο-4-χλωρο-2-φαινυλοπυριδαίν-3-(2H)-όνη		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
606-036-00-9	Chinomethionat (ISO) 6-μεθυλο-1,3-διετολο(4,5-β)-κανοξάλιν-2-όνη		219-455-3	2439-01-2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22-48/22 Xi: R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/ 53-62 S: (2-)24-37-60-61		
606-037-00-4	Triadimefon (ISO) 1-(4-χλωροφαινοξυ)-3,3-διμεθυλο-1-(1,2,4-τριαζωλ- 1-υλο)βουτανόνη		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρασκευάσματα
606-044-00-2	2,4,6-τριμεθυλοβενζοφαινόλη		403-150-9	954-16-5	Xv; P22 Xi; P36 N; P50-53	Xv; N P: 22-36-50/53 Σ: (2-)26-60-61		
607-043-00-X	Dicamba (ISO) Ντικάμπα 3,6-δichλωρο-2-μεθοξυβενζοϊκό οξύ		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2-)26-61		
607-057-00-6	Coumachlor 3-[1-(4-χλωροφαινυλ)-3-οξοβουτυλ]-4-υδροξυκου- μαρίνη		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)37-61		
607-058-00-1	Coumataryl (ISO) Κουμαφουρύλ 4-υδροξυ-3-[3-οξο-1-(2-φουρυλο)βουτυλο]κουμαρίνη		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2-)37-45-61		
607-079-00-6	Kelevan (ISO) 5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10-δεκαχλωρο-4-υδροξυτε- ντακυκλο(5,2,1,0 ^{2,6} ,0 ^{3,9} ,0 ^{5,8})δεκα-4-υλ)-4-οξοβα- λερανικό αιθύλιο		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
607-097-00-4	1,2-ανυδρίτης του βενζολο-1,2,4-τρικαρβοξυλικού οξέος		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-143-00-3	Βαλεριανικό οξύ		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) 2,3,6-τριχλωροβενζοϊκό οξύ		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	Benazolin (ISO) 4-χλωρο-2,3-διυδρο-2-οξο-1,3-βενζοθειαζολιν- 3-υλοξείκό οξύ		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)22-61		
607-156-00-4	Chlorfenson (ISO) 4-χλωροβενζολοσουλφονικό 4-χλωροφαινόλιο		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-158-00-5	Χλωροξείκό νάτριο		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2-)22-37-45-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρά-σκευάσματα
607-159-00-0	Chlorobenzilate (ISO) 4,4'-δυχλωροφενζυλικός αιθυλεστέρας		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
607-176-00-3	Μείγμα των: α-3-(3-(2H-βενζοφουραζολ-2-υλο)-5-τριτοαξές-βουτυλ-4-υδροξυφαινόλη)προπιονυλο-ω-υδροξυεπύλυ(οξείναιθυλένιο)α-3-(3-(2H-βενζοφουραζολ-2-υλο)-5-τριτοαξές-βουτυλ-4-υδροξυφαινόλη)προπιονυλο-ω-3-(3-(2H-βενζοφουραζολ-2-υλο)-5-τριτοαξές-βουτυλ-4-υδροξυφαινόλη)προπιονυλοξυ-πολυ(οξείναιθυλένιο)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-36/37-61		
607-188-00-9	N-καρβοξυλοαιθυλο-N-δεκαεστ-9-ενυλομυρλεϊνικό οξύνο νάτριο		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24/37-61		
607-209-00-1	Μείγμα από: (τριβείο) διδαιομυρμηκικό Ο,Ο'-δι-σοπροπύλιο, (τετραβείο)διδαιομυρμηκικό Ο,Ο'-δι-σοπροπύλιο, (πενταβείο)διδαιομυρμηκικό Ο,Ο'-δισοπροπύλιο		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-36/37-60-61		
607-213-00-3	3,3-δις[(1,1-διμεθυλοπροπυλ)υπεροξυ]βουτυρικό αιθύλιο		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2)-3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-(4-(2,6-διοξο-2,6-δυδρο-7-φαινόλο-1,5-διοξάν-δακεν-3-υλο)φαινοξυ)οξικό 2-αιθοξυαιθύλιο		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-24-37-61		
607-243-00-7	3,6-δυχλωρο-ο-ανισικό νάτριο [1] 3,6-δυχλωρο-ο-ανισικό οξύ, ένωση με 2,2'-μινωδι-αιθανόλη (1:1) [2] 3,6-δυχλωρο-ο-ανισικό οξύ, ένωση με 2-αμινοαιθα-νόλη (1:1) [3]	217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]	1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61			
607-248-00-4	Naphtalam-sodium		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικά με παρασκευάσματα
607-249-00-X	Διακυλικό (1-μεθυλ-1,2-αθανοδιολο)δης [οξυ(μεθυλ-2,1-αθανοδιόλιο)]		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 10%: Xi; R36/37/38-43 1% ≤ C < 10%: Xi; R43	
607-252-00-6	λ-κυαλοδρίνη (ISO)		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-)28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	Fluroxypyr (ISO) 4-αμνο-3,5-δυχλωρο-6-φθορο-2-πυριδολοξοξικό οξύ		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	Ακυλοντριλίο	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20%: T; R45-23/24/25-37/38-41-43 10% ≤ C < 20%: T; R45-23/24/25-41-43 5% ≤ C < 10%: T; R45-23/24/25-36-43 1% ≤ C < 5%: T; R45-23/24/25-43 0,2% ≤ C < 1%: T; R45-20/21/22 0,1% ≤ C < 0,2%: T; R45	
608-016-00-5	1,4-δικοανο-2,3,5,6-τετρα-χλωρο-βενζόλιο		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
609-030-00-4	Dinoseb (ISO) 2-τριτοπαιγής βουτυλο-4,6-δινιτροφαινόλη	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	Nitrofen (ISO) 2,4-δυχλωροφαινόλο-4-νιτροφαινόλικος αιθέρας	E	217-406-0	1836-75-5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	Teconazene (ISO) 1,2,4,5-τετραχλωρο-3-νιτροβενζόλιο		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρά-σκευάσματα
611-008-00-4	4-αμινοαζοβενζόλιο		200-453-6	60-09-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	1-υδροξυ-7-(3-σουλφοφυκτοανιλνο)-2-(3-μεθυλο-4-(2-μεθοξυ-4-(3-σουλφοφυκτοανιλνο)φαινυλαξω)φαινυλαξω)-ναφθαλενο-3-σουλφοφυκτοφολιδόλιο		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	4,4'-(4-μνοκυκλοεξά-2,5-διενυλιδένομεθυλενο)διανιλίνη υδροχλωρική CI Basic Red 9		209-321-2	569-61-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-μεθοξυανιλίνη ο-ανισιδίνη	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	Βενζιδίνη 4,4'-διαμνο-1,1'-διφαινόλιο	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25%: T; R45-22 0,01% ≤ C < 25%: T; R45	
612-051-00-1	4,4'-διαμνοδιφαινόλιομεθάνιο 4,4'-μεθυλενοδιανιλίνη	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/ 21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	Άλατα της 4,4'-δι-οτολοιδίνης	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-μεθυλο-μ-φαινυλενοδιαμίνη	E	202-453-1	95-80-7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-(πιπεραζίν-1-υλ)αυθολαμίνη		205-411-0	140-31-8	Xn, R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικές με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικές με παρα- σκευάσματα
612-111-00-7	2-μεθυλο-μ-φαινυλενοδιαμίνη		212-513-9	823-40-5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2-)24-36/37-61		
612-125-00-3	2-μεθυλο-π-φαινυλενοδιαμίνη		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2-)24-37-45-61		
612-144-00-7	Flumetralin (ISO) N-(2-χλωρο-6-φθοροβενζυλ)-N-αιθυλ-α,α,α-τριφ- θορο-2,6-δινιτρο-π-τολουϊδίν η		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
612-151-00-5	Διαμνοτολουόλιο	E	246-910-3	25376-45-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	Μορφακουλ (ISO) ών του 1,1'-δισ(3,5-διμεθυλομορφολινοκαρβονου- λμεθυλο)-4,4'-διπυριδίου		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-)22-36-61		
613-031-00-5	Συμκλοσένιο Τριχλωροϊσοκυανουρικό οξύ		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-)8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6-φαινυλο-1,3,5-τριαζινο-2,4-δυσλοδιαμίνη		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
613-042-00-5	Imazalil (ISO) 1-[2-(αλλυλοξυ)-2-(2,4-διχλωροφαινυλ)αιθυλο]- 1H-ιμιδαζόλιο		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-043-00-0	Υδρογονθειικό 1-[2-(αλλυλοξυ)αιθυλο-2-(2,4-δι- χλωροφαινυλο)]-1H-ιμιδαζόλιο [1] Υδρογονθειικό (±)-1-[2-(αλλυλοξυ)αιθυλο- 2-(2,4-δισχλωροφαινυλο)]-1H-ιμιδαζόλιο [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παρά-σκευάσματα
613-066-00-6	Terbutometon (ISO) 2-τριπ-βουτυλαμινο-4-αμιδουλαμινο-6-μεθοξύ-1,3,5-τριαζίνη		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
613-091-00-2	Morfamquat dichloride [1] Morfamquat sulfate [2]	225-062-8 [1]		4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61		
613-098-00-0	N-(η-οκτυλο)-2-πυρρολιδιόνη		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2)-23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	Hexaconazole (ISO) (RS)-2-(2,4-διχλωροφαινυλ)-1-(1H-1,2,4-τριαζολ-1-υλ)εξάν-2-όλη		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-131-00-9	Pyroquilon (ISO) 1,2,5,6-τετραυδροπυρρολο[3,2,1-ij]κενολιν-4-όνη		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-134-00-5	Myclobutanil (ISO) 2-(4-χλωροφαινυλ)-2-(1H-1,2,4-τριαζολ-1-υλ)μεθύλ εξανοντρίλιο		—	88671-89-0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2)-36/37-46-61		
613-137-00-1	Methabenzthiazuron (ISO) 1-(1,3-βενζοθειαζολ-2-υλ)1,3-διμεθυλοουρία		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	Metsulfuron-methyl 2-(4-μεθοξύ-6-μεθύλο-1,3,5-τριαζιν-2-υλ)καρβαμυλοσουλφονυλο)βενζοϊκό μεθύλιο		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	Νικοτινή (ISO)		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2)-36/37-45-61		
614-006-00-1	Βρυκίνη		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)-13-45-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικά με παρασκευάσματα
614-007-00-7	Θεική βρουκίνη [1] Νιτρική βρουκίνη [2] Στρυχνίν-10-όνη, 2,3-διμεθοξύ-, μονο[(R)-1-μεθυλεπύλιο 1,2-βενζολοδικαρβοξυλικό] [3] Στρυχνίν-10-όνη, 2,3-διμεθοξύ-, ένωση με 1,2-βενζολοδικαρβοξυλικό-(S)-μονο(1-μεθυλοεπύλιο) (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)/13-45-61		
615-006-00-4	Διοσκυανικό 2-μεθύλο-m-φανυλάνιο [1] Διοσκυανικό 4-μεθύλο-m-φανυλάνιο [2] Διοσκυανικό m-τολυλάνιο [3] 2,6-δισοκυανικό τολουόλιο [1] 2,4-δισοκυανικό τολουόλιο [2] Διοσκυανικό τολουόλιο [3]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2)/23-36/37-45-61	C ≥ 20%: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7% ≤ C < 20%: T+; R26-40-42/43 1% ≤ C < 7%: T; R23-40-42/43 0.1% ≤ C < 1%: Xn; R20-42	2
616-010-00-9	Τουαλχωραμίδιο του νατρίου		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2)/7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	Pyracarbolid (ISO) 3,4-διδρο-6-μεθύλο-2H-πυρανο-5-καρβοξυανιλίδιο		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	Cymoxanil 2-κυανο-N-[(αδουλαμνο)καρβονυλο]-2-(μεθοξυ)μιν) ακεταμίδιο		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)/36/37-60-61		
617-004-00-9	Υδροπυροξείδιο του 1,2,3,4-τετραδρό-1-ναφθυλίου		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2)/3/7-14-26 -36/37/39-45-60-61	C ≥ 25%: C; R22-34 10% ≤ C < 25%: C; R34 5% ≤ C < 10%: Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	Υπεροξείδιο του δις(α,α-διμεθυλοσβενζυλίου)		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2)/3/7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	Υπεροξείδιο του διβενζυλίου		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2)/3/7-14-36/37/39		
650-007-00-3	Chlordimeform (ISO) N ² -(4-χλωρο-ο-τολουόλιο)-N',N'- διμεθυλοφορμαμίδην		228-200-5	6164-98-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2)-22-36/37-60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικάς με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμωση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικάς με παράσκευασματα
650-008-00-9	Drazoxolon (ISO) 4-(2-χλωροφθανυλιδραζολο)-3-μεθυλ-5-ισοξαιζολίνη		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	Chlordimeform hydrochloride N'-(4-χλωρο-ο-τολυλο)-N,N-διμεθυλοφθορμαμίδη μονοδρωχλωρική		243-269-1	19750-95-9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
650-033-00-5	Esfenvalerate Βουτυρικό (S)-α-κυανο-3-φαινοξυβενζυλ-(S)- 2-(4-χλωροφθανυλ)-3-μεθύλο		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	Triasulfuron 1-[2-(2-χλωροαιθοξυ)φθανυλσουλφονυλ]-3- (4-μεθοξυ-6-μεθυλο-1,3,5-τριαζίν-2-υλ)ουρία		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1Δ

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
006-090-00-8	Φανυλοκαρβαμικό 2-(3-ιωδοπροπ-2-υν-1-υλοξυ)αιθύλιο		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2)-22-26-39-61		
014-016-00-0	Μείγμα από: 1,3-διεξ-5-εν-1-υλο-λ-1,1,3,3-τετραμεθυλοδιισλοξάνιο; 1,3-διεξ-π-5-εν-1-υλο-1,1,3,3-τετραμεθυλοδιισλοξάνιο		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	P,P'-(1-υδροξυαιθυλιόνο)δισ(όξινοοσοφωνικό)δι-ένυδρο ασβέστιο		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Μείγμα από: διεξαιθροφωσφορικό S,S',S'-τετραφαινυλοεισίδας (4,1-φαινυλενο)δισουλφόνιο, εξαιθροφωσφορικό διφαινυλο(4-φαινυλοδείοφαινυλο)σουλφόνιο		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2)-15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-δισ(2,6-δι-πριποταγές-βουτυλο-4-μεθυλοφαινοξυ)-2,4,8,10-τετραοξά-3,9-διφωσφασιπτερο[5,5]ενδεκάνιο		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	3-(υδροξυφαινυλοφωσφινυλο)προπανοϊκό οξύ		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
601-050-00-1	Βενζολίου, C ₁₀ H ₁₃ -αλκυλοπαράγωγα		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-φαινυλοβουτ-1-ένιο		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2)-37-61		
602-083-00-4	Διφαινυλ-αιθέρας, πενταβρωμο παράγωγο		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-φθόρο-1-διχλωροαιδιάνιο		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(φαινυλομεθοξυ)ναφθαλένιο		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
603-129-00-6	1-τριτοπανής-βουτοξυπροπαν-2-όλη		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2)-26-39		
603-130-00-1	Μείγμα από ισομερή του α-(διμεθυλοδιφαινυλο)-ω-υδροξύπολυ(οξύαιθυλενίου)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-39-61		
603-131-00-7	Μείγμα (3:1) από: 1-δεοξυ-1-[μεθυλο-(1-οξοδω-δεκυλ)αμινο]-D-γλυκτόλη, 1-δεοξυ-1-[μεθυλο-(1-οξοδεκαετρακυλ)αμινο]-D-γλυκτόλη		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-132-00-2	2-ισοπροπυλο-9-μεθυλο-1,4-διοξασπειρο[4,5]δεκα-2-ολομεθανόλη		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2)-26-37/39-61		
603-133-00-8	Μείγμα από: 3-[(4-αμινο-2-γλωφα-5-νιτροφαι-νυλ)αμινο]προπαν-1,2-διόλη; 3,3',5-νιτρο-2-γλωφο-1,4-φαινυλενοδιμυνο)δισ(προπαν-1,2-διόλη)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-22-36-61		
603-134-00-3	Μείγμα από αντικατεστημένους δωδεκυλο ή/και τετραδεκυλο, διφαινυλ αδέρφες. Η ουσία παράγεται κατά την αντίδραση Friedel Crafts. Ο καταλύτης απομακρύνεται από το προϊόν της αντίδρασης. Ο διφαινυλιδέρφας αντικαθίσταται από C1-C10 αλκυλομάδες. Οι αλκυλομάδες συνδέονται τυχαία ανάμεσα σε C1 και C6. Γραμμικά C12 και C14, χρησιμοποιούνται σε αναλογία 50/50.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	Δισ[[2,2',2"-νιτρολοτρις(αιθανολικο)]-1-N,O]δισ[2-(2-μεθοξυαιθοξύ)αιθοξύ]-πυράνιο		410-500-4	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2)-26-39-61		
603-136-00-4	3-((4-(δισ(2-υδροξυαιθυλο)αμινο)-2-νιτροφαινυλο)αμινο)-1-προπανόλη		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-24-37-61		
603-137-00-X	Μείγμα από 1-διοξυ-1-[μεθυλο-(1-οξοεξάδε-κυλο)αμινο]-D-γλυκτόλη, 1-διοξυ-1-[μεθυλο-(1-οξοοκταδεκυλο)αμινο]-D-γλυκτόλη		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-διμεθυλο-3-υδροξυπροπολυ)τολουόλιο		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
604-050-00-X	4-χλωρο-ο-κρεζόλη		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25%: T; C; R23-35 10% ≤ C < 25%: C; R20-35 5% ≤ C < 10%: C; R20-34 3% ≤ C < 5%: Xn; R20-36/37/38 1% ≤ C < 3%: Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-δισ(3,5-δι-τριπτοταγής-βουτυλ-4-υδροξύ)βενζολο)-2,4,6-τριμεθυλοφαινόλη		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-μεθυλενοδισ(6-(2H-βενζοτριάζολ-2-υλο)-4-(1,1,3,3-τετραμεθυλοφουτυλο)φαινόλη)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-μεθυλο-4-(1,1-διμεθυλοαιθυλο)-6-(1-μεθυλοδεκαπεντυλο)-φαινόλη		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
604-054-00-1	Μείγμα από 2-μεθοξύ-4-(τετραϊδρο-4-μεθυλενο-2H-πυραν-2-υλο)-φαινόλη; 4-(3,6-διωδρο-4-μεθυλο-2H-πυραν-2-υλο)-2-μεθοξύφαινόλη		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-(3,3',5',5'-τετραμεθυλο-(1,1'-διφαινυλο)-4,4'-δυλο)-δισ(οξυμεθυλενο)-δισ-οξείριαντο		413-900-7	85954-11-6	Muta.Cat.3; R40	Xn R: 40 S: (2)-22-36-37		
605-027-00-7	Μείγμα από: 3α,4,5,6,7,7α-εξαιδρο-4,7-μεθανο-1ρ-ινδανο-6-καρβοξυαλδεαδή; 3α,4,5,6,7,7α-εξαιδρο-4,7-μεθανο-1ρ-ινδανο-5-καρβοξυαλδεαδή		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
606-051-00-0	4-πεντοκυκλοεξανόνη		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-διβουτυλαμινο)-2-υδροξύ-2'-καρβοξύ-βενζοφαινόνη		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	Fluoroxypyr-meryl (ISO) [1] Fluoroxypyr-butometry (ISO) [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισημωση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παραμετωπίσματα
607-273-00-0	7-(2,6-διμεθυλο-8-(2,2-διμεθυλοβουτυρυλοξυ)-1,2,6,7,8,8α-εξαιδρο-1-ναφθυλο)-3,5-διυδροξυεπτανικό αμμόνιο		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	3-αμνοκροτονικό 2-(N-βενζυλο-N-μεθυλαμινο)αθ		405-350-1	54527-73-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-275-00-1	4-(βενζυλοξυ)βενζοσουλφονικό νάτριο		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-276-00-7	Σύμπλοκο μεθυργύριου του δις[(1-μεθυλοϊμιδαζολο)-(2-αθυλο-εξανοϊκού)] εστερα		405-635-0	—	Xi: R38-41 N: R50-53	Xi: N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-277-00-2	Μείγμα από: 2-(εξυλοδεσιο)αιθυλαμίνη υδροχλωρική, προπιονικό νάτριο		405-720-2	—	Xn: R22 Xi: R41 R43 N: R51-53	Xn: N R: 22-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-278-00-8	Μείγμα των ισομερών των: φαιναθιλοναφθαλενοσουλφονικό νάτριο, ναφθυλοαιθυλοβενζοσουλφονικό νάτριο		405-760-0	—	Xi: R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
607-279-00-3	Μείγμα του: n-δεκακυλοαμινοδιαθιλλιο δις(όξινο μηλικό), n-δεκακυλοαμινοδιαθιλλιο όξινο μηλικό όξινο φθάλικο		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-280-00-9	4-χλωρο-1-υδροξυβουτανό-1-σουλφονικό νάτριο		406-190-5	54322-20-2	Xn: R22 Xi: R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2)-22-26-36/37		
607-281-00-4	Μείγμα από διακαλασιμένα και γραμμικά C7-C9-αλκύλια-3-[3-(2H-βενζοτριάζολ-2-υλο)-5-(1,1-διμεθυλοαιθυλο)] (προποινικά C7+C9 6%, C8 92%)		407-000-3	127519-17-9	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	Οξικός 2-ακετοξυμεθυλο-4-βενζυλοξυβουτ-1-υλεστέρας		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
607-283-00-5	4-οξο-4-φαινυλοκροτονικός Ε-αιθυλεστεράς		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2)-26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	Μείγμα (9:1) από 3,3'-[1,4-φαινυλενοδισ(καρβονυλιμινο-3,1-προπανοδιυλιμινο)]δισ(10-αμινο-6,13-δihλωρο)-4,11-τριφαινοδιοξαινό δισουλφονικό νάτριο, 3,3'-[1,4-φαινυλενοδισ(καρβονυλιμινο-3,1-προπανοδιυλιμινο)]δισ(10-αμινο-6,13-dihλωρο)-4,11-τριφαινοδιοξαινό δισουλφονικό λιθίο		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	Μείγμα από 7-(((3-αμινοφαινυλο)σουλφονυλο)αμινο)-ναφθαλενο-1,3-σουλφονικού οξέος, 7-(((3-αμινοφαινυλο)σουλφονυλο)αμινο)-ναφθαλενο-1,3-σουλφονικού νατρίου, 7-(((3-αμινοφαινυλο)σουλφονυλο)αμινο)-ναφθαλενο-1,3-σουλφονικού καλίου		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-286-00-1	Μείγμα από: 7-[[[3-[[4-(2-υδροξυ-ναφθυλ)αζω]φαινυλ]αζω]φαινυλ]σουλφονυλ]αμινο]ναφθαλενο-1,3-δισουλφονικό νάτριο/κάλιο		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2)-22-24-37-61		
607-287-00-7	Ο-μεθυλο-Ο-(1-μεθυλο-2-μεθακυλοϋλοξυαιθύλο)-1,2,3,6-τετραυδροφθαλικός εστεράς		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	(μ)-(3-(1-(3-(ε-6-dihλωρο-5-κυανοπυριμιδινό-γ-υλο(μεθυλο)αμινο)προπυλο)-1,6-διυδρο-2-υδροξυ-4-μεθυλο-6-οξο-3-πυριδινυλ)ω)-4-σουλφονικοφαινυλοσουλφονυλο)φθαλοκυαννο-a,b,d-τρισουλφονικό(6-γ)νικελικό Π τετρανάτριο, όπου α είναι 1 ή 2 ή 3 ή 4 b είναι 8 ή 9 ή 10 ή 11, c είναι 15 ή 16 ή 17 ή 18, d είναι 22 ή 23 ή 24 ή 25 και όπου e και f μαζί είναι 2 και 4 ή 4 και 2 αντίστοιχως		410-160-7	148732-74-5	Xi; R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2)-22-26-36/37-61		
607-289-00-8	3-(3-(4-(2,4-δισ(1,1-διμεθυλοπροπυλο)φαινοξυ)βουτυλοαμινο)καρβονυλο-4-υδροξυ-1-ναφθαλενυλο)προπανοϊκό οξύ		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Μείγμα [άνωστης αναλογίας] από αμιμονιακός 1-C14-C18-ακυλοεκαρβονυλο-2-(3-αλλυλοξυ-2-υδροξυεπτοαεκαρβονυλο)αιθύλο-1-σουλφονικός εστεράς, αμιμονιακός 2-C14-C18-ακυλοξυκαρβονυλο-1-(3-αλλυλοξυ-2-υδροξυεπτοαεκαρβονυλο)αιθύλο-1-σουλφονικός εστεράς		410-540-2	—	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-291-00-9	διωκευλο-w-(C5/C6-κυκλοακυλο)ακυλο καρβονυλικός εστεράς		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
607-292-00-4	Μείγμα από: [1-(μεθοξυμεθυλο)-2-(C12-αλκυλο)-αθόξυ]οξικό οξύ [1-(μεθοξυμεθυλο)-2-(C14-αλκυλο)-αθόξυ]οξικό οξύ		410-640-6	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2)-26-37/39-60-61		
607-293-00-X	Μείγμα από: δι-σουλφονικός Ν-αμινοαιθυλοπτεράσωνικός μονο-2,4,6-τριμεθυλοσενναϊλοδιφαινυλαϊθέρας, δι-σουλφονικός Ν-αμινοαιθυλοπτεράζωνικός δι-2,4,6-τριμεθυλοσενναϊλοδιφαινυλαϊθέρας		410-650-0	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2)-26-36/37/39-61		
607-294-00-5	2-βενζυλοξυ-1-υδροξυαιθανο-σουλφονικό νάτριο		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
607-295-00-0	Μείγμα από: φωσφοσενναϊνο-1,2-δικαρβοξυλικό τετρανάτριο, φωσφοσενναϊνο-1,2,3,4-τετρακαρβοξυλικό ξανάτριο		410-800-5	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
607-296-00-6	Μείγμα των τετραεστέρων της πενταεθιρβόλης με επτασικό οξύ και 2-αιθυλεξανοϊκό οξύ		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(E-E)-3,3'-(1,4-φαινυλενοδιμεθυλιδανο)δις(2-οξοβεννανο-10-σουλφονικό οξύ)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2)-26-39		
607-298-00-7	2-τριμεθυλαμωνιακός αιθοξυκαρβοξυβενζολο-4-σουλφονικός εστέρας		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-36/37		
607-299-00-2	3-(ακετυλοθειο)-2-μεθυλο-προπανοϊκός μεθυλεστέρας		411-040-7	97101-46-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
607-300-00-6	[2-(2,6-διφθορο-5-χλωροπυριμιδιν-4-υλαμινο)-5-(β-σουλφαμυλο-c,d-σουλφονικοφθαλοκυαν-α-υλο-k4,N29,N30,N31,N32-σουλφονυλαμινο)βενζοϊκό(5-)]χλωκικό(II) τρινάτριο, όπου a = 1, 2, 3, 4 b = 8, 9, 10, 11 c = 15, 16, 17, 18 d = 22, 23, 24, 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-22-24-37		
607-301-00-1	Μείγμα από: δωδεκανοϊκό οξύ, πολυ(1-7)-γαλακτοκοί εστέρες του δεκατετρανοϊκού οξέος		411-860-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
607-302-00-7	Μείγμα από: δεκατετρανικό οξύ, πολυ(1-7)-γαλακτικοί εστέρες του δεκατετρανικού οξέος		411-910-6	—	Xi; R 38-41 R43 N; R 51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-κυκλοπροπυλο-6,7-διϋδρο-1,4-διϋδρο-4-οξοκυκλολ-1-υλο)μεθυλο]βουτανοντριπλιο		413-760-7	931107-30-3	Repr. Cat.3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-χλωροφαινόλη)-2-φαινόλη-2-[(1H-1,2,4-τριαζόλη-1-υλο)μεθυλο]βουτανοντριπλιο		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-βουτυλο-N-φαναυλαμινο)φαινόλη)αδουλενο-1,1,2-τρικαρβοντριπλιο		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-νιτρο-4,5-δισ(βενζυλοξυ)φαινόληκατεντριπλιο		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	Τρινιτρομεθανοϋδραζίνη		414-850-9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-βρωμο-2-νιτρο-1-(2-φορυλ)αδουλενο		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	Μείγμα 2:1:1 από: N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6-[2-αμινο-4-(ή 6)-υδροξυ-(ή 4-αμινο-2-υδροξυ)φαινόλη]-6'-(1-καρβανιλο)-2-υδροξυπροπ-1-ενολάτω]-5',5''-δισουλφαινόλο-3,3''-δισουλφονικιδες(ναφθαλενο-2,1'-αζωβενζολο-1,2'-διολικό O(1),O(2'))-χρωμικό τριπάριο N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-δισ(1-καρβανιλο)-2-υδροξυπροπ-1-ενολάτω]-5',5''-δισουλφαινόλο-3,3''-δισουλφονικιδες(ναφθαλενο-2,1'-αζωβενζολο-1,2'-διολικό-O(1),O(2'))-χρωμικό τριπάριο-N(1')-N(2):N(1'')-N(2'')-η-6,6''-δισ[2-αμινο-4-(ή 6)-υδροξυ-(ή 4-αμινο-2-υδροξυ)φαινόλη]-5',5''-δισουλφαινόλο-3,3''-δισουλφονικιδες(ναφθαλενο-2,1'-αζωβενζολο-1,2'-διολικό-O(1),O(2'))-χρωμικό τριπάριο		402-850-1		Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
611-044-00-0	Μείγμα από: δισ [1-(2-υδροξυ-5-νιτροφαινυλο)αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)-τριτοταγής-αλκυλο(C12-C14) αμμωνιακός χρωμικός εστέρας(1-), δισ[1-(2-υδροξυ-4-νιτροφαινυλο)αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)-τριτοταγής-αλκυλο(C12-C14) αμμωνιακός εστέρας (1-), δισ[1-[[5-(1,1-διμεθυλοσπριπολο)-2-υδροξυ-3-νιτροφαινυλο]αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)]-τριτοταγής-αλκυλο(C12-C14) αμμωνιακός χρωμικός εστέρας(1-), δισ[[1-(2-υδροξυ-5-νιτροφαινυλο)αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)]-τριτοταγής-αλκυλο(C12-C14) αμμωνιακός χρωμικός εστέρας(1-), [[1-[[5-(1,1-διμεθυλοσπριπολο)-2-υδροξυ-3-νιτροφαινυλο]αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)]-1-[[2-υδροξυ-5-νιτροφαινυλο)αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)]-τριτοταγής-αλκυλο(C12-C14) αμμωνιακός χρωμικός εστέρας(1-), [[1-[[5-(1,1-διμεθυλοσπριπολο)-2-υδροξυ-3-νιτροφαινυλο]αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)]-1-[[2-υδροξυ-4-νιτροφαινυλο)αζώ]-2-ναφθαλενολικός(2)]-τριτοταγής-αλκυλο(C12-C14) αμμωνιακός χρωμικός εστέρας (1-)		403-720-7	117527-94-3	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-ακεταξιβουτυλο)-N-αιθυλο]αμινο-2-μεθυλοφαινυλο]αζώ]-3-ακετυλο-5-νιτροδεναινίο		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-διαμινο-2-μεθυλαζωβενζόλιο		407-590-2	43151-99-1	T: R25 Xn: R48/22 R43 N: R50-53	T: N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2)/22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	Μείγμα 1:1 από: 2-[[4-[N-αιθυλο-N-(2-ακετοξυαιθυλο)αμινο]φαινυλο]αζώ]-5,6-δihλωροβενζοθειάζωλιο, 2-[[4-[N-αιθυλο-N-(2-ακετοξυαιθυλο)φαινυλο]αζώ]-6,7-dihλωροβενζοθειάζωλιο		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	Μείγμα 1:1 από: 2-[[4-[δισ(2-ακετοξυαιθυλο)αμινο]φαινυλο]αζώ]-5,6-dihλωροβενζοθειάζωλιο, 2-[[4-[δισ(2-ακετοξυαιθυλο)αμινο]φαινυλο]αζώ]-6,7-dihλωροβενζοθειάζωλιο		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικά με παρασκευάσματα
611-049-00-8	7-[4-(3-διαθιλαμινοπροπιλαμινο)-6-(3-διαθιλαμινοπροπιλαμινο)-1,3,5-τριαζίν-2-υλαμινο]-4-υδροξύ-3-(4-φαινυλαξωφαινυλαξω)-αφθάλεινο-2-σουλφονικό, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2)-(22-36)/37-61		
611-051-00-9	Χλωρίδιο του 2-(4-(N-αθιλο-N-(2-υδροξύ)αιθιλο)αμινο-2-μεθυλοφαινυλαξω-6-μεθυξύ-3-μεθυλο-βενζοϊσοθειοαζολίου		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	Μονωτάριο ύδωρ-[5-[2,4-διυδροξύ-5-(2-υδροξύ-3,5-διητροφαινυλο)αξω]φαινυλο]αξω]-2-ναφθαλενοσουλφονικό], σύμπλοκο σιδήρου		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Μείγμα από: τριδεκαξύλομεθυλαμιμόνιο χλωριούχο, διδεκαξύλοδιμεθυλαμιμόνιο χλωριούχο		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2)-26-39-60-61		
612-157-00-8	Υδροχλωρική(2)-1-βενζο[β]βεν-2-υλαιθανόξιμη		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2)-22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	Μείγμα από: δις(5-δωδεκυλο-2-υδροξύ)βενζυλαδ-οξίμικός) χλωρίδης(II) C12-αλκυλικές ομάδες είναι διακλαδισμένες, 4-δωδεκυλοσαλικυλαλδοξίμη		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Πρόσθια αντίδρασης των τριμεθυλοεξαιμεθυλονοδιαμίνης ένα μείγμα από 2,2,4-τριμεθυλο-1,6-εξανωδιαμίνη και 2,4,4-τριμεθυλο-1,6-εξανωδιαμίνη, κατάλογος EINECS), εποξείδιο 8 (μονο)[(C10-C16-ακυλοξύ)μεθυλο]οξείρανιου παράγωγα και p-τολουενο-σουλφονικό οξύ		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2)23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-τριτοαγές-βουτυλο-5-(4-τριτοαγές-βουτυλοβενζυλοξείδιο)-4-χλωροπυριδαίν-3(2H)-όνη		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2)36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(πιπεραζινο-1,4-δωλο)διπροπιλο]δισ-(1H-βενζιμιδαξω)[2,1-b]βενζο[m,n][3,8]φαινανθρολινο-1,3,6-τριόνη)		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Index No	Χημική ονομασία	Σημειώσεις σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημειώσεις σχετικά με παρασκευάσματα
613-151-00-8	1-(3-μεθυλοξείν-5-τριπλοξυμεθύλο-2-D-θρεοφυρλο)θιμίνη		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	N-(4,6-διμεθοξυπυριμιδιν-2-υλο)καρβαμικό φανύλλο		406-600-2	89392-03-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-τριχλωροπυριδίνη		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-αμνο-4-χλωρο-6-μεθοξυπυριμιδίνη		410-050-9	5734-65-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)-22		
613-155-00-X	2,3-διφθορο-5-χλωρο-πυριδίνη		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2)-23-36-61		
613-156-00-5	2-βουτυλο-4-χλωρο-5-φορμυλοϊμιδαζόλιο		410-260-0	83857-96-9	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-157-00-0	2,4-διαμνο-5-μεθοξυμεθυλοπυριμιδίνη		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi; R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2)-22-26-36		
613-158-00-6	2,3-διχλωρο-5-τριφθορομεθύλο-πυριδίνη		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2)-24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-διμεθυλαθύλο)φαινυλ]-αιθύλ]κινάσολίνη		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N: R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2)-37-45-60-61		
613-160-00-7	Διυδροβρωμίδιο του (1S)-2-μεθύλο-2,5-διαζωδικυκλο[2.2.1]επτανίου		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
615-022-00-1	3-ισοκτιανοσουλφονυλο-2-θειοφαινο-καρβοξυλικό μεθύλιο		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2)-22-30-35-36/37		

Index No	Χημική ονομασία	Σημείωση σχετικά με ουσίες	Αριθ. ΕΚ	Αριθ. CAS	Ταξινόμηση	Επισήμανση	Όρια συγκέντρωσης	Σημείωση σχετικά με παρασκευάσματα
615-023-00-7	2-(ισοκτιανοσουλφονυλομεθυλο)βενζοϊκούξέος μεθυλεστεράς		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. Cat.3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2)-23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(4-αθυλο-2-υδροξυφαιλυλο-3,5-διχλωρο)-2-(3-δεκαπεντυλοφαινοξυ)-βουταναμίδιο		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-χλωρο-3-κτιανο-5-φορμυλο-2-θιενυλάτω)-5'-διαθυλαμμο-2-μεθοξυακετανιλίδιο		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-χλωρο-7-μεθυλοπυραζόλο(1,5-b)-1,2,4-τριάζωλ-4-υλο)προπυλο)-2-(2,4-δι-τριτοπαγές-πεντυλοφαινοξυ)οκταναμίδιο		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	Μείγμα από: 2,2',2''-2'''-(αθθυλενοδιητριοτε-τρακίς-N,N-δι(C16)αλκυλακεταμίδιο; 2,2',2'',2'''-(αθθυλενοδιητριοτε-τρακίς-N,N-δι(C18)αλκυλακεταμίδιο		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2)-24-37		
616-048-00-6	3'-τριφθορομεθυλοσφουρανιλίδιο		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2)-22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-δισ(1,1-διμεθυλοαθθυλο)φαινοξυ)-N-(3,5-διχλωρο-4-αθθυλο-2-υδροξυφαιλυλο)-εξαναμίδιο		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-διχλωρο-4-(1,1,2,3,3,3-εξαφθοροπροποξυ)-φαιλυλο-αμινοκαρβονυλο]-2,6-διφθοροβενζαμίδιο		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
616-051-00-2	Μείγμα από: 2,4-δισ(N'-(4-μεθυλοφαιλυλο)-σπρεϊδο)-τολουόλιο, 2,6-δισ(N'-(4-μεθυλοφαιλυλο)-σπρεϊδο)-τολουόλιο		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	Δισ(4-μεθυλοβενζυλο)υπεροξείδιο		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2)-7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	Cyproconazol (ISO) (2RS,3RS;2RS,3SR)-2-(4-χλωροφαιλυλο)-3-κυκλοπροπυλο-1-(1H-1,2,4-τριάζωλ-1-υλο)βουτον-2-όλη		—	94361-06-5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2)-36/37-60-61		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

R 66

IT: L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DA γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DE γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FI γλώσσα)

(Δεν αφορά τη SV γλώσσα)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3Α

S 23

FR: Ne pas respirer les gaz/fumées/vapeurs/aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant].

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά την DA γλώσσα)

(Δεν αφορά την DE γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά την FI γλώσσα)

(Δεν αφορά την SV γλώσσα)

S 26

DE: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά την DA γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά την FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά την FI γλώσσα)

(Δεν αφορά την SV γλώσσα)

S 56

DE: Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά την DA γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά την FI γλώσσα)

(Δεν αφορά την SV γλώσσα)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3B

S 27/28

DE: Bei Berührung mit der Haut beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen und Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben).

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά την DA γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά την FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά την FI γλώσσα)

(Δεν αφορά την SV γλώσσα)

S 29/56

ES: No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

DE: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.

EN: Do not empty into drains, dispose of this material and its container to hazardous or special waste collection point.

IT: Non gettare i residui nelle fognature; smaltire questo materiale e i relativi contenitori in un punto di raccolta di rifiuti pericolosi o speciali.

NL: Afval niet in de gootsteen werpen; deze stof en de verpakking naar een inzamelpunt voor gevaarlijk of bijzonder afval brengen.

SV: Töm ej i avloppet, lämna detta material och dess behållare till insamlingsställe för farligt avfall.

(Δεν αφορά την DA γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά την FI γλώσσα)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4Α

«B.10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — IN VITRO ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. Προετοιμασίες

1.4.1.1. Κύτταρα

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

1.4.1.2. Μέσο και συνθήκες καλλιέργειας

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

1.4.1.3. Ετοιμασία των καλλιεργειών

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

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

1.4.1.4. Μεταβολική ενεργοποίηση

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

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

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

1.4.1.5. Υπό δοκιμή ουσία/Προετοιμασία

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

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Διαλύτης/φορέας

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

1.4.2.2. Συγκεντρώσεις εκθέσεως

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

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

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

Για σχετικά μη κυτταροτοξικές ουσίες, η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι 5 μl/ml, 5 mg/ml ή 0,01 M, όποια από τις τρεις είναι χαμηλότερη.

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

1.4.2.3. Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες

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

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

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

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

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

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

1.4.3. Διαδικασία

1.4.3.1. Κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία

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

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

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

1.4.3.3. Χρόνος συλλογής καλλιιεργειας

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

1.4.3.4. Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων

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

1.4.3.5. Ανάλυση

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

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

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΙΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

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

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

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

Κύτταρα:

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

Συνθήκες δοκιμής:

- ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφρασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια έκθεσης των κυττάρων,
- αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού των καλλιεργιών συμπεριλαμβανομένων, π.χ. στοιχείων κυτταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- σύσταση του μέσου καλλιέργειας και συγκέντρωση CO₂, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,
- όγκος του φορέα και της προστεθείσας υπό δοκιμή ουσίας,
- θερμοκρασία επώασης,
- χρόνος επώασης,
- διάρκεια της κατεργασίας,
- πυκνότητα των κυττάρων στην ανακαλλιέργεια, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και κριτηρίων αποδοχής,
- θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες,
- μέθοδοι προετοιμασίας των αντικειμενοφόρων,
- κριτήρια καταμέτρησης των εκτροπών,

- αριθμοί των αναλυθεισών μεταφάσεων,
- μέθοδοι για τις μετρήσεις τοξικότητας,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης.

Αποτελέσματα:

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

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
- (2) Ishidate, M. Jr. and Sofuni, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5. Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford. pp. 427—432.
- (3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Andersen, G. and Zeiger, E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl. 10), pp. 1—175.
- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147—204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297—305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347—364.
- (7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173—215.

- (8) Natarajan, A. T., Bates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, J. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83—90.
- (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277—290.
- (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175—177.
- (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Berid, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85—88.
- (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Iven, J. L., Kirkland, D. J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241—261.
- (13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141—154.
- (14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139—149.
- (15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooley, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91—103.
- (16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795—801.
- (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403—413.
- (18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362—1364.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4B

«B.11. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — IN VIVO ΔΟΚΙΜΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΕΚΤΡΟΠΩΝ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή, μέρος Β.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

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

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

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

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

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

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

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

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. Προετοιμασίες

1.4.1.1. Επιλογή ζωικών ειδών

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

1.4.1.2. Συνθήκες στέγασης και διατροφής

Εφαρμόζονται οι γενικές συνθήκες που αναφέρονται στην γενική εισαγωγή του μέρους Β, αν και ο στόχος για την υγρασία θα πρέπει να είναι 50-60%.

1.4.1.3. Προετοιμασία των ζώων

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

1.4.1.4. Προετοιμασία των δόσεων

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

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Διαλύτης/φορέας

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

1.4.2.2. Μάρτυρες

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

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να προκαλούν δομικές εκτροπές *in vivo* σε επίπεδα έκθεσης που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Οι δόσεις των θετικών μαρτύρων θα πρέπει να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από

εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας και να δειγματίζονται μόνο μία φορά. Εφόσον υπάρχουν, μπορεί να εξετάζεται η χρήση θετικών μαρτύρων παρόμοιας χημικής τάξης. Παραδείγματα ουσιών θετικών μαρτύρων είναι:

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

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

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. Αριθμός και φύλο των ζώων

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

1.5.2. Χρονοδιάγραμμα αγωγής

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

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

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

1.5.3. Επίπεδα δόσεων

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

1.5.4. Δοκιμή οριακής δόσης

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να κριθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Σε δοκιμές μεγαλύτερης διάρκειας, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μέχρι 14 ημέρες και 1 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μεγαλύτερη από 14 ημέρες. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. Χορήγηση των δόσεων

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

1.5.6. Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων

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

1.5.7. Ανάλυση

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

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

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

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

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

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

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

Εξετασθέντα ζώα:

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

Συνθήκες δοκιμής:

- θετικός και αρνητικός (φορέας/διαλύτης) μάρτυρες,
- στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,
- αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δόσεως,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,

- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης,
- μέθοδοι επαλήθευσης του ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη διαίτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον χρειάζεται,
- στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού,
- λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,
- μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,
- ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,
- μέθοδοι προετοιμασίας αντικειμενοφόρων,
- κριτήρια καταμέτρησης των εκτροπών,
- αριθμός εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διαφορούμενης.

Αποτελέσματα:

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

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- (1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds.). IRL Press, Oxford, Washington D. C., 275—306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, 157—165.

- (3) Richold, M., Chandly, A., Ashby, J., Gatehouse D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland, (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New Cork, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.
 - (4) Tice, R. R. Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Paccierotti, F., Preston R. J., Romagna F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *In Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305—312.
 - (5) Fielder, R. J., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313—319.
 - (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland, (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184—232.
 - (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.* 119, pp. 403—413.
 - (8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1363—1364.»
-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4Γ

«B.12. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — IN VIVO ΔΟΚΙΜΗ ΜΙΚΡΟΠΥΡΗΝΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

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

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

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

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

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος B.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

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

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

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

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

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. Προετοιμασίες

1.4.1.1. Επιλογή ζωικών ειδών

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

1.4.1.2. Συνθήκες στέγασης και διατροφής

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

1.4.1.3. Προετοιμασία των ζώων

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

1.4.1.4. Προετοιμασία των δόσεων

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

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Διαλύτης/φορέας

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

1.4.2.2. Μάρτυρες

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

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

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

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

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

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. Αριθμός και φύλο των ζώων

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

1.5.2. Χρονοδιάγραμμα αγωγής

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

Η δοκιμή μπορεί να εκτελεστεί με δύο τρόπους:

- τα ζώα υποβάλλονται σε εφάπαξ αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία. Στην περίπτωση του μυελού των οστών λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον δύο φορές, ξεκινώντας το νωρίτερο 24 ώρες μετά την αγωγή, αλλά μην υπερβαίνοντας τις 48 ώρες από την αγωγή με κατάλληλα διαστήματα μεταξύ των δειγμάτων. Τυχόν λήψη δείγματος πριν από την παρέλευση 24 ωρών μετά την αγωγή θα πρέπει να αιτιολογείται. Στην περίπτωση του περι-

φερικού αίματος λαμβάνονται δείγματα τουλάχιστον δύο φορές, ξεκινώντας το νωρίτερο 36 ώρες μετά την αγωγή και αφήνοντας να περάσει κατάλληλο χρονικό διάστημα από την πρώτη δειγματοληψία για τη λήψη των επομένων αλλά όχι αργότερα από τις 72 ώρες. Εφόσον σε μία δειγματοληψία εντοπιστεί θετική απόκριση, δεν απαιτείται η λήψη άλλου δείγματος.

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

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

1.5.3. Επίπεδα δόσεων

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

1.5.4. Δοκιμή οριακής δόσης

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία εφαρμόζεται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Σε μελέτες μεγαλύτερης διάρκειας, η οριακή δόση είναι 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα για αγωγή μέχρι 14 ημέρες και 1 000 mg/kg βάρους σώματος/day για αγωγή μεγαλύτερη από 14 ημέρες. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να αποτελέσει ένδειξη ότι πρέπει να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. Χορήγηση δόσεων

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

1.5.6. Προετοιμασία του μυελού/αίματος

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

1.5.7. Ανάλυση

Η αναλογία των άωρων στο σύνολο (άωρα + ώριμα) των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται για κάθε ζώο μετρώντας ένα σύνολο τουλάχιστον 200 ερυθροκυττάρων για το μυελό των οστών και 1 000 ερυθροκυττάρων για το περιφερικό αίμα (17). Όλες οι αντικειμενοφόροι, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων,

θα πρέπει να λαμβάνουν ένα διαφορετικό κωδικό πριν από την εξέταση στο μικροσκόπιο. Για τον προσδιορισμό της συχνότητας εμφάνισης άωρων ερυθροκυττάρων με μικροπυρήνα καταμετρώνται τουλάχιστον 2 000 άωρα ερυθροκύτταρα ανά ζώο. Μπορούν να ληφθούν και άλλες πληροφορίες καταμετρώντας ώριμα ερυθροκύτταρα για μικροπυρήνες. Κατά την εξέταση των αντικειμενοφόρων, η αναλογία των άωρων στο σύνολο των ερυθροκυττάρων δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 20% της τιμής του μάρτυρα. Όταν τα ζώα υποβάλλονται σε αγωγή συνεχώς για τέσσερις ή και περισσότερες εβδομάδες, για τη συχνότητα εμφάνισης μικροπυρήνων μπορούν να καταμετρηθούν επίσης τουλάχιστον 2 000 ώριμα ερυθροκύτταρα ανά ζώο. Ως εναλλακτικός τρόπος εκτίμησης αντί εκείνου με τα χέρια, μπορούν να γίνουν δεκτά και συστήματα αυτόματης ανάλυσης (ανάλυση εικόνας και κυτταρομετρία ροής κυτταρικών εναιωρημάτων), εφόσον υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση και επικύρωση.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

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

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης φορέας:

— αιτιολόγηση της επιλογής του φορέα,

— διαλυτότητα και σταθερότητα της υπό δοκιμή ουσίας στο διαλύτη/φορέα, εφόσον είναι γνωστές.

Εξετασθέντα ζώα:

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

Συνθήκες δοκιμής:

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

Αποτελέσματα:

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

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187—190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9—15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61—118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29—80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, pp., 555—558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103—112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513—522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245—249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83—98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995). Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 153—159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *In Vivo*, Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293—304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313—319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313—319.
- (14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241—247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269—275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91—104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97—99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report, Part I, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184—232.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4Δ

«B.13/14. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΠΕΝΕΣΗ — ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος B.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

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

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

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

1.3. ΑΡΧΙΚΕΣ ΘΕΩΡΗΣΕΙΣ

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

Η δοκιμή βακτηριακής αναστροφής μετάλλαξης χρησιμοποιείται συνήθως ως μία αρχική δοκιμή προσανατολισμού για τη γονοτοξική δραστηριότητα και, ιδιαίτερα, την επάγουσα σημειακές μεταλλάξεις. Από πολυάριθμα συλλεγμένα στοιχεία καταδεικνύεται ότι πολλά χημικά που είναι θετικά στη δοκιμή αυτή εμφανίζουν μεταλλαξιγόνο δράση και σε άλλες δοκιμές. Υπάρχουν παραδείγματα μεταλλαξιγόνων παραγόντων που δεν ανιχνεύονται με τη δοκιμή αυτή. Οι

ατέλειες αυτές μπορούν να αποδοθούν στην ειδική φύση του ανιχνευόμενου τελικού σημείου, στις διαφορές στη μεταβολική ενεργοποίηση ή στις διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα. Από την άλλη μεριά, παράγοντες που ενισχύουν την ευαισθησία της δοκιμής βακτηριακής ανάστροφης μετάλλαξης μπορούν να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της μεταλλαξιγόνου δραστηριότητας.

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

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

1.4. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

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

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

1.5. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.5.1. Προετοιμασίες

1.5.1.1. Βακτήρια

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

Η συνιστώμενη θερμοκρασία επώσεως είναι 37°C.

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

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

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

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

1.5.1.2. Θρεπτικό μέσο

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

1.5.1.3. Μεταβολική ενεργοποίηση

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

1.5.1.4. Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία

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

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

1.5.2. Συνθήκες δοκιμής

1.5.2.1. Υπό δοκιμή στελέχη (βλέπε σημείο 1.5.1.1)

1.5.2.2. Συγκέντρωση εκδόσεως

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

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

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

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

1.5.2.3. Αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες

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

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

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

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

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

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Ερυθρό του Κονγκό	573-58-0	209-358-4

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

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

Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS	Στέλεχος
Αζίδιο του νατρίου	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 και TA 100
2-νιτροφθορένιο	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-αμινοακρινιδίνη	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 και TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 και TA 97a
Υδροπεροξειδίο του κουμενίου	80-15-9	201-254-7	TA 102
Μιτομυκίνη C	50-07-7	200-008-6	WP2 unvA και TA 102
N-αιθυλο-N-νιτρο-N-νιτροζογουανιδίνη	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2unvA και WP2unvA(pKM101)
4-νιτροκινολιν-1-οξειδίο	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2unvA και WP2unvA(pKM101)
Φουρλοφουραμίδιο (AF2)	3688-53-7		Στελέχη περιέχονται πλασμίδιο

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

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

1.5.3. Διαδικασία

Στη μέθοδο της προσθήκης σε τρυβλίο (1) (2) (3) (4), χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0,05 ml ή 0,1 ml των διαλυμάτων δοκιμής, 0,1 ml πρόσφατης βακτηριακής καλλιέργειας (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και 0,5 ml στείρου ρυθμιστικού διαλύματος με 2,0 ml άγαρ επιστρώσεως. Στη δοκιμή με μεταβολική ενεργοποίηση, αναμειγνύονται συνήθως 0,5 ml μίγματος μεταβολικής ενεργοποίησης που περιέχει κατάλληλη ποσότητα μεταμιτοχονδριακού κλάσματος (της τάξεως του 5 έως 30% v/v στο μείγμα μεταβολικής ενεργοποίησης) με το άγαρ επιστρώσεως (2,0 ml), μαζί με τα βακτήρια και την ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα ανακατεύεται και φέρεται στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Το άγαρ επιστρώσεως αφήνεται να στερεοποιηθεί πριν από την επώαση.

Στη μέθοδο της προεπώσεως (2) (3) (5) (6), η ουσία δοκιμής/διάλυμα δοκιμής προεπώζεται με το υπό δοκιμή στέλεχος (που περιέχει περίπου 10^8 βιώσιμα κύτταρα) και στέιρο ρυθμιστικό διάλυμα ή το σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης (0,5 ml) συνήθως για 20 λεπτά ή και περισσότερο στους 30-37 °C πριν να αναμειχθεί με το άγαρ επιστρώσεως και να επιστρωθεί στην επιφάνεια τρυβλίου με ελάχιστο άγαρ. Συνήθως, 0,05 ή 0,1 ml της υπό δοκιμή ουσίας/διαλύματος δοκιμής, 0,1 ml βακτηρίων και 0,5 ml S9-μείγματος ή στείρου ρυθμιστικού αναμειγνύονται με 2,0 ml άγαρ επιστρώσεως. Οι σωλήνες, κατά τη διάρκεια της επώασης, θα πρέπει να αερίζονται με τη χρήση ανατάρακτη.

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

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

1.5.4. Επόαση

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

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

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

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

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

3. ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

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

Στελέχη:

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

Συνθήκες δοκιμής:

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

Αποτελέσματα:

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

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347—364.
- (2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173—215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217—233.
- (4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69—240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters*, 1, pp. 91—96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273—285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13—61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167—177.

- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res.*, 38, pp. 33—42.
- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and J. W. Bridges (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141—161.
- (11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453—465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335—344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33—47.
- (14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2—141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249—258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421—441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780—3782.
- (18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961—4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285—291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85—88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175—177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the *Salmonella*/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343—350.
- (23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83—91.
- (24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28—65.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4E

«B.17. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ — IN VITRO ΔΟΚΙΜΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η in vitro δοκιμή κυτταρικής γονιδιακής μετάλλαξης στα θηλαστικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων που προκαλούνται από χημικές ουσίες. Στις κατάλληλες κυτταρικές σειρές περιλαμβάνονται L5178Y λεμφωματικά κύτταρα ποντικού, οι CHO, CHO-AS52 και V79 σειρές κυττάρων κινέζικου κρικητού και TK6 ανθρώπινα λεμφοβλαστοειδή κύτταρα (1). Στις κυτταρικές αυτές σειρές τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα γενετικά τελικά σημεία μετρούν μετάλλαξη σε θυμιδινοκινάση (TK) και φωσφοριβοζυλοτρανσφεράση υποξανθίνης-γουανίνης (HPRT) καθώς και ένα διαγονίδιο φωσφοριβοζυλοτρανσφεράσης ξανθίνης-γουανίνης (XPRT). Οι δοκιμές μετάλλαξης TK, HPRT και XPRT ανιχνεύουν διάφορα φάσματα γενετικών συμβάντων. Το γεγονός ότι οι TK και XPRT βρίσκονται σε αυτοσώματα μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση γενετικών συμβάντων (π.χ. μεγάλες απαλείψεις) που δεν ανιχνεύονται στο γενετικό τόπο HPRT σε X-χρωμοσώματα (2) (3) (4) (5) (6).

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

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

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

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος B.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

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

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. Προετοιμασίες

1.4.1.1. Κύτταρα

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

Η δοκιμή θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να έχει προκαθορισμένη ευαισθησία και ισχύ. Ο αριθμός των κυττάρων, οι καλλιέργειες και οι συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν αυτές τις καθορισμένες παραμέτρους (14). Ο ελάχιστος αριθμός βιώσιμων κυττάρων που επιζούν της κατεργασίας και χρησιμοποιούνται σε κάθε στάδιο της δοκιμής θα πρέπει να βασίζεται στη συχνότητα αυθόρμητης μετάλλαξης. Ένας γενικός κανόνας είναι να χρησιμοποιείται αριθμός κυττάρων που να είναι τουλάχιστον δεκαπλάσιος του αντιστρόφου της συχνότητας αυθόρμητης μετάλλαξης. Συνιστάται πάντως να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον 10^6 κύτταρα. Θα πρέπει να υπάρχει ιστορικό κατάλληλων στοιχείων για το χρησιμοποιούμενο κυτταρικό σύστημα που να αποδεικνύει τη συνεπή αποδοτικότητα της δοκιμής.

1.4.1.2. Θρεπτικά μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα μέσα καλλιέργειας και συνθήκες επώασης (δοχεία καλλιέργειας, θερμοκρασία, συγκέντρωση CO_2 και υγρασία). Τα θρεπτικά μέσα θα πρέπει να επιλέγονται ανάλογα με τα συστήματα επιλογής και τον κυτταρικό τύπο που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή. Παίζει σημαντικό ρόλο οι συνθήκες καλλιέργειας να ελεγχονται έτσι ώστε να διασφαλίζεται η άριστη ανάπτυξη των κυττάρων κατά τη διάρκεια της περιόδου εκφράσεως και η ικανότητα σχηματισμού αποικιών μεταλλαγμένων και μη κυττάρων.

1.4.1.3. Προετοιμασία των καλλιέργειών

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

1.4.1.4. Μεταβολική ενεργοποίηση

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

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

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

1.4.1.5. Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία

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

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Διαλύτης/φορέας

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

1.4.2.2. Συγκεντρώσεις εκθέσεως

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

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

Για την ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τέσσερις τουλάχιστον συγκεντρώσεις. Εφόσον εμφανίζονται φαινόμενα κυτταροτοξικότητας, οι συγκεντρώσεις αυτές θα πρέπει να καλύπτουν μία περιοχή από τη μέγιστη μέχρι μικρή ή και μηδενική τοξικότητα. Αυτό σημαίνει συνήθως ότι οι συγκεντρώσεις δεν θα πρέπει να διαφέρουν περισσότερο από ένα συντελεστή μεταξύ 2 και $\sqrt{10}$. Εφόσον η μέγιστη συγκέντρωση βασίζεται στην κυτταροτοξικότητα, θα πρέπει να έχει ως αποτέλεσμα ένα ποσοστό 10-20% (όχι όμως λιγότερο από 10%) σχετικής επιβίωσης (σχετικής αποτελεσματικότητας κλωνοποίησης) ή σχετικής συνολικής ανάπτυξης. Για σχετικώς μη κυτταροτοξικές ουσίες, η μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής θα πρέπει να είναι 5 μl/ml, 5 mg/ml ή 0,01 M, όποια από τις τρεις είναι χαμηλότερη.

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

1.4.2.3. Μάρτυρες

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

Παραδείγματα ουσιών-θετικών μαρτύρων είναι:

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

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

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

1.4.3. Διαδικασία

1.4.3.1. Κατεργασία με την υπό δοκιμή ουσία

Πολλαπλασιασθέντα κύτταρα θα πρέπει να εκτίθενται στην υπό δοκιμή ουσία με και χωρίς μεταβολική ενεργοποίηση. Η έκθεση θα πρέπει να διαρκεί για κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήθως 3-6 ώρες είναι αρκετό). Ο χρόνος έκθεσης μπορεί να αντιστοιχεί σε ένα ή περισσότερους κυτταρικούς κύκλους.

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

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

1.4.3.2. Μέτρηση επιβίωσης, βιωσιμότητας και συχνότητας προϊόντων μετάλλαξης

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

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

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

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

3. ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης φορέας:

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

Κύτταρα:

- τύπος και πηγή των κυττάρων,
- αριθμός των κυτταρικών καλλιεργειών,
- αριθμός κυτταρικών διελεύσεων, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μέθοδοι συντήρησης της κυτταρικής καλλιέργειας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- απουσία μυκοπλάσματος.

Συνθήκες δοκιμής:

- αιτιολογία για την επιλογή των συγκεντρώσεων και του αριθμού των καλλιεργειών συμπεριλαμβανομένων, π.χ. στοιχείων κυτταροτοξικότητας και περιορισμών από πλευράς διαλυτότητας, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- σύσταση του μέσου καλλιέργειας, συγκέντρωση CO₂,
- συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας,
- όγκος του φορέα και της προστιθέμενης υπό δοκιμή ουσίας,
- θερμοκρασία επώασης,
- χρόνος επώασης,
- διάρκεια της κατεργασίας,
- πυκνότητα των κυττάρων κατά την κατεργασία,
- τύπος και σύσταση του συστήματος μεταβολικής ενεργοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και κριτηρίων αποδοχής,
- θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες,
- διάρκεια της περιόδου έκφρασης (συμπεριλαμβανομένου του αριθμού των ανακαλλιεργηθέντων κυττάρων και των υποκαλλιεργειών και διαγραμμάτων διατροφής, εφόσον συντρέχει περίπτωση),
- παράγοντες επιλογής,
- κριτήρια για την κατάταξη μιας δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διφορούμενης,

- μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την καταγραφή του αριθμού των βιώσιμων και των μεταλλαγμένων κυττάρων,
- ορισμός των αποικιών σχετικά με το μέγεθος και τον τύπο τους (συμπεριλαμβανομένων των κριτηρίων κατάταξης σε "μικρές" και "μεγάλες" αποικίες, εφόσον συντρέχει περίπτωση).

Αποτελέσματα:

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

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindall, K. R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E. H. Y. and Malling, H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306—1312.
- (3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.*, 94, pp. 467—485.
- (4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394—403.
- (5) Aaron, C. S. and Stankowski, Jr. L. F. (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.*, 223, pp. 121—128.
- (6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, pp. 235—239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147—204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225—251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environment Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17—36.

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135—141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9—17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindall, K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133—147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedures for the L5178Y/TK⁺ — TK⁻ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239—268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith, J. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66—101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.*, 46, pp. 365—373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347—364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat Res.*, 59, pp. 61—108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173—215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcome, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175—177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot. R. M. (eds.) Elsevier, North-Holland, pp. 85—88.
- (21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, In: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91—103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795—801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51—55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C. Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) and Mutants of L5178Y/TK⁺ Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res*, 151, pp. 161—174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.*, 229, pp. 89—102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK⁺ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis* 5, pp. 609—614.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4ΣΤ

«B.23. ΔΟΚΙΜΗ ΣΠΕΡΜΟΓΟΝΙΑΚΗΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗΣ ΕΚΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

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

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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

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

Στη δοκιμή αυτή χρησιμοποιούνται συνήθως τρωκτικά. Αυτή η in vivo κυτταρογενετική δοκιμή ανιχνεύει χρωμοσωμικές εκτροπές σε σπερμογονιακές μιτώσεις. Άλλα κύτταρα στόχοι δεν αποτελούν αντικείμενο της μεθόδου αυτής.

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

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

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

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

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος B.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

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

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

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

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

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

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

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

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

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΟΚΙΜΗΣ

1.4.1. Προετοιμασίες

1.4.1.1. Επιλογή ζωικών ειδών

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

1.4.1.2. Συνθήκες στέγασης και διατροφής

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

1.4.1.3. Προετοιμασία των ζώων

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

1.4.1.4. Προετοιμασία των δόσεων

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

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Διαλύτης/φορέας

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

1.4.2.2. Μάρτυρες

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

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

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

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

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

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1.5.1. Αριθμός ζώων

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

1.5.2. Χρονοδιάγραμμα αγωγής

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

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

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

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

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

1.5.3. Επίπεδα δόσεων

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

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

1.5.4. Δοκιμή οριακής δόσης

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος/ημέρα στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να θεωρηθεί ως μη αναγκαία η εκτέλεση πλήρους μελέτης με τρία επίπεδα δόσης. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να δώσει μία ένδειξη της ανάγκης για χρησιμοποίηση υψηλότερου επιπέδου δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. Χορήγηση δόσεων

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

1.5.6. Προετοιμασία των χρωμοσωμάτων

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

1.5.7. Ανάλυση

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

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

Εφόσον παρατηρηθεί μίτωση καθώς επίσης και μείωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο λόγος των μιτώσεων σπερματογόνιων προς την πρώτη και δεύτερη μειωτική μετάφαση ως μέτρο της κυτταροτοξικότητας για όλα τα υποβληθέντα σε αγωγή ζώα και τους αρνητικούς μάρτυρες σε συνολικό δείγμα 100 διαφεμένων κυττάρων ανά ζώο για τον προσδιορισμό της δυνατής κυτταροτοξικής επίδρασης. Εφόσον παρατηρείται μόνο μίτωση, θα πρέπει να προσδιορίζεται ο δείκτης μιτώσεως σε 1 000 τουλάχιστον κύτταρα για κάθε ζώο.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

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

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

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

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

3. ΕΚΘΕΣΗ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

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

Εξετασθέντα ζώα:

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

Συνθήκες δοκιμής:

- στοιχεία από τη μελέτη του εύρους, εφόσον έγινε,
- αιτιολογία της επιλογής του επιπέδου δόσεως,
- αιτιολογία της χρησιμοποιηθείσας οδού χορήγησης,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολογία του χρονικού σημείου της θυσίας,

- μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη διαίτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- στοιχεία για την ποιότητα της τροφής και του νερού,
- λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,
- μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,
- ταυτότητα της ουσίας αναστολής της μετάφρασης, συγκέντρωση αυτής και διάρκεια της αγωγής,
- μέθοδοι ετοιμασίας αντικειμενοφόρων,
- κριτήρια για τη μέτρηση των εκτροπών,
- αριθμός εξετασθέντων κυττάρων ανά ζώο,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διαφορούμενης.

Αποτελέσματα:

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

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert B., and Magnusson, J. (eds.) Liss, New York, pp. 477—484.
- (2) Adler, I. D. (1984), Cytogenic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, ed. S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275—306.
- (3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289—294.

- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115—141.
 - (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207—209.
 - (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka, N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313—318.
 - (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313—319.
 - (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184—232.»
-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4Ζ

«B.39. ΔΟΚΙΜΗ ΜΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΕΝΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ DNA (UDS) ΜΕ ΗΠΑΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ IN VIVO**1. ΜΕΘΟΔΟΣ**

Η παρούσα μέθοδος αποτελεί αντίγραφο της OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells In Vivo (1997).

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σκοπός της δοκιμής μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών in vivo είναι η αναγνώριση ουσιών που επάγουν επιδιόρθωση του DNA στα ηπατικά κύτταρα υποβληθέντων σε αγωγή ζώων (1) (2) (3) (4).

Αυτή η in vivo δοκιμή παρέχει μέθοδο για τη διερεύνηση των γονοτοξικών επιδράσεων χημικών ουσιών στο ήπαρ. Το μετρούμενο τελικό σημείο είναι ενδεικτικό της βλάβης του DNA και της επακόλουθης επιδιόρθωσης στα ηπατικά κύτταρα. Το ήπαρ είναι συνήθως ο κυριότερος τόπος μεταβολισμού των απορροφούμενων ενώσεων. Αποτελεί συνεπώς πρόσφορο τόπο για τη μέτρηση της βλάβης του DNA in vivo.

Εφόσον υπάρχουν ενδείξεις ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν θα φθάσει στον ιστό στόχο, δεν ενδείκνυται να χρησιμοποιείται η δοκιμή αυτή.

Το τελικό σημείο της μη προγραμματισμένης σύνθεσης DNA (UDS) μετρείται προσδιορίζοντας την πρόσληψη επισημασμένων νουκλεοσιδίων σε κύτταρα που δεν υπόκεινται σε προγραμματισμένη (S-φάση) σύνθεση DNA. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι ο προσδιορισμός της πρόσληψης επισημασμένης με τρίτιο θυμιδίνης ($^3\text{H-TdR}$) με αυτοακτινογράφιση. Για τις in vivo δοκιμές UDS χρησιμοποιείται κατά προτίμηση ήπαρ από επίμυες. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι ιστοί αντί για ήπαρ, αυτό όμως δεν αποτελεί αντικείμενο της παρούσας μεθόδου.

Η ανίχνευση αποκρίσεως UDS εξαρτάται από τον αριθμό των βάσεων DNA που αποκόπηκαν και αντικαταστάθηκαν στο σημείο της βλάβης. Συνεπώς, η δοκιμή UDS έχει ιδιαίτερη αξία για την ανίχνευση εκτεταμένων επιδιορθώσεων (20-30 βάσεις) που προκαλούνται από ουσίες. Αντιθέτως, οι περιορισμένες επιδιορθώσεις (1-3 βάσεις) ανιχνεύονται με πολύ μικρότερη ευαισθησία. Περαιτέρω, μεταλλαξιογόνα συμβάντα μπορεί να προκύψουν λόγω μη επιδιόρθωσης, κακής επιδιόρθωσης ή κακής αντιγραφής αλλοιώσεων DNA. Η έκταση της απόκρισης UDS δεν αποτελεί ένδειξη για την πιστότητα της διεργασίας επιδιόρθωσης. Επιπλέον, μπορεί ένα μεταλλαξιογόνο να αντιδρά με το DNA αλλά η βλάβη του DNA να μην επιδιορθώνεται με τη διεργασία της επιδιόρθωσης αποκοπής. Η έλλειψη εξειδικευμένων πληροφοριών για τη μεταλλαξιογόνο δραστηριότητα από τη δοκιμή UDS αντισταθμίζεται από την εν δυνάμει ευαισθησία αυτού του τελικού σημείου επειδή μετρείται σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος B.

1.2. ΟΡΙΣΜΟΙ

Κύτταρα σε επιδιόρθωση: καθαρός πυρηνικός κόκκος (NNG) μεγαλύτερος από μία προκαθορισμένη τιμή που πρέπει να αιτιολογείται από το εργαστήριο που διεξάγει τη δοκιμή.

Καθαροί πυρηνικοί κόκκοι (NNG): ποσοτικό μέτρο της UDS δραστηριότητας κυττάρων σε αυτοακτινογραφικές δοκιμές UDS που υπολογίζεται αφαιρώντας το μέσο αριθμό κυτταροπλασματικών κόκκων σε πυρηνοϊσοδύναμες κυτταροπλασματικές περιοχές (CG) από τον αριθμό των πυρηνικών κόκκων (NG): $\text{NNG} = \text{NG} - \text{CG}$. Ο αριθμός των NNG υπολογίζεται για τα μεμονωμένα κύτταρα και κατόπιν αθροίζονται για τα κύτταρα μιας καλλιέργειας, παράλληλων καλλιεργειών, κ.λπ.

Μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA (UDS): Επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη προκληθείσα από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες.

1.3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η δοκιμή UDS με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών in vivo δείχνει επιδιορθωτική σύνθεση DNA μετά την αποκοπή και απομάκρυνση τμήματος DNA που περιλαμβάνει περιοχή που έχει υποστεί βλάβη από χημικές ουσίες ή φυσικούς παράγοντες. Η δοκιμή στηρίζεται συνήθως στην προσθήκη $^3\text{H-TdR}$ στο DNA ηπατικών κυττάρων που εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα κυττάρων στην S-φάση του κυτταρικού κύκλου. Η πρόσληψη $^3\text{H-TdR}$ προσδιορίζεται συνήθως με αυτοακτινογράφιση επειδή η τεχνική αυτή δεν είναι τόσο επιδεκτική σε παρεμβολές από κύτταρα S-φάσης όπως, π.χ., η υγρή σπινθηρογραφία.

1.4. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

1.4.1. Προετοιμασίες

1.4.1.1. Επιλογή ζωικών ειδών

Συνήθως χρησιμοποιούνται επίμυες, αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα κατάλληλα είδη θηλαστικών. Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συνήθως χρησιμοποιούμενες εργαστηριακές φυλές νεαρών υγιών ενήλικων ζώων. Στην αρχή της δοκιμής, οι διαφορές στα βάρη των ζώων θα πρέπει να είναι ελάχιστες και να μην υπερβαίνουν το $\pm 20\%$ του μέσου βάρους για κάθε φύλο.

1.4.1.2. Συνθήκες στέγασης και διατροφής

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

1.4.1.3. Προετοιμασία των ζώων

Υγιή νεαρά ενήλικα ζώα χωρίζονται τυχαία σε ομάδες μαρτυρίας και αγωγής. Τα κλουβιά θα πρέπει να διατάσσονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιούνται τυχόν επιδράσεις από τη θέση των κλουβιών. Τα ζώα λαμβάνουν μία και μοναδική ταυτότητα και παραμένουν στα κλουβιά τους τουλάχιστον πέντε ημέρες πριν από την έναρξη της δοκιμής για να μπορέσουν να εγκλιματιστούν στις εργαστηριακές συνθήκες.

1.4.1.4. Υπό δοκιμή ουσία/προετοιμασία

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

1.4.2. Συνθήκες δοκιμής

1.4.2.1. Διαλύτης/φορέας

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

1.4.2.2. Μάρτυρες

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

Οι θετικοί μάρτυρες θα πρέπει να είναι ουσίες που είναι γνωστό ότι εμφανίζουν το φαινόμενο της UDS όταν χορηγούνται σε δόσεις εκδόσεως που αναμένεται να δώσουν ανιχνεύσιμη αύξηση πάνω από το βασικό όριο. Θετικοί μάρτυρες που χρειάζονται μεταβολική ενεργοποίηση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε δόσεις που παρέχουν μέτρια απόκριση (4). Οι δόσεις μπορούν να επιλέγονται έτσι ώστε τα αποτελέσματα να είναι σαφή αλλά να μην αποκαλύπτουν αμέσως την ταυτότητα των κωδικοποιημένων αντικειμενοφόρων στον παρατηρητή. Παραδείγματα ουσιών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θετικοί μάρτυρες είναι:

Χρόνος δειγματοληψίας	Ουσία	Αριθ. CAS	Αριθ. EINECS
Πρώτες δειγματοληψίες (2-4 ώρες)	N-νιτροζωδιμεθυλαμίνη	62-75-9	200-249-8
Δεύτερες δειγματοληψίες (12-16 ώρες)	N-2-φλθορενυλοακεταμίδιο (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Ως θετικοί μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες κατάλληλες ουσίες. Επίσης, οι θετικοί μάρτυρες μπορούν να χορηγούνται και από οδό διαφορετική από εκείνη της υπό δοκιμή ουσίας.

1.5. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ**1.5.1. Αριθμός και φύλο των ζώων**

Θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατάλληλος αριθμός ζώων ώστε να λαμβάνεται υπόψη η φυσική βιολογική ποικιλία στην απόκριση. Κάθε ομάδα θα πρέπει να αποτελείται από τρία τουλάχιστον ζώα για εξέταση. Εφόσον υπάρχουν σημαντικά πρότερα στοιχεία, για τις ομάδες μάρτυρες, θετικών και αρνητικών, απαιτούνται μόνον ένα ή δύο ζώα.

Εάν κατά το χρόνο της έρευνας υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από μελέτες στο ίδιο είδος και με την ίδια οδό έκθεσης που αποδεικνύουν ότι δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές στην τοξικότητα μεταξύ των φύλων, τότε αρκεί η δοκιμή να γίνει σε ζώα ενός φύλου, κατά προτίμηση αρσενικά. Εφόσον η έκθεση σε μια χημική ουσία αφορά μόνο το ένα φύλο, όπως π.χ. στην περίπτωση φαρμακευτικών ουσιών, η δοκιμή θα πρέπει να πραγματοποιείται με ζώα του αντίστοιχου φύλου.

1.5.2. Χρονοδιάγραμμα αγωγής

Οι εξεταζόμενες ουσίες χορηγούνται εν γένει με μία μόνη αγωγή.

1.5.3. Επίπεδα δόσεων

Κανονικά, χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο επίπεδα δόσεων. Η μέγιστη δόση ορίζεται ως η δόση που παρέχει σημάδια τοξικότητας τέτοια ώστε τυχόν υψηλότερα επίπεδα δόσης, με βάση το ίδιο δοσολογικό καθεστώς, να αναμένεται φυσιολογικά να οδηγήσουν σε φαινόμενα θνησιμότητας. Γενικά, η χαμηλότερη δόση αντιστοιχεί στο 50 % έως 25 % της υψηλής δόσης.

Ουσίες με ειδικές βιολογικές δράσεις σε χαμηλές μη τοξικές δόσεις (όπως ορμόνες και μιτωγόνα) μπορεί να αποτελούν εξαιρέσεις στα κριτήρια ρύθμισης των δόσεων και θα πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Εάν πραγματοποιηθεί μελέτη διαπίστωσης του εύρους επειδή δεν υπάρχουν κατάλληλα διαθέσιμα δεδομένα, η μελέτη αυτή θα πρέπει να πραγματοποιείται στο ίδιο εργαστήριο, με το ίδιο είδος, φυλή, φύλο και αγωγή που χρησιμοποιούνται και στην κύρια μελέτη.

Η μέγιστη δόση μπορεί επίσης να οριστεί και ως η δόση που παρέχει ενδείξεις τοξικότητας στο ήπαρ (π.χ. πυκνωτικούς πυρήνες).

1.5.4. Δοκιμή οριακής δόσης

Εάν μία δοκιμή με ένα επίπεδο δόσης τουλάχιστον 2 000 mg/kg βάρους σώματος στην οποία χρησιμοποιείται μία μόνη αγωγή, ή δύο αγωγές την ίδια μέρα, δεν δώσει ορατά τοξικά αποτελέσματα, και εφόσον δεν αναμένεται η εμφάνιση γονοτοξικότητας με βάση στοιχεία από ουσίες σχετικής δομής, τότε μπορεί να μην είναι αναγκαία η πραγματοποίηση πλήρους μελέτης. Η αναμενόμενη ανθρώπινη έκθεση μπορεί να δώσει μία ένδειξη για το αν χρειάζεται να χρησιμοποιηθεί υψηλότερο επίπεδο δόσης στη δοκιμή οριακής δόσης.

1.5.5. Χορήγηση δόσεων

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

1.5.6. Προετοιμασία των ηπατικών κυττάρων

Τα ηπατικά κύτταρα λαμβάνονται από υποβληθέντα σε αγωγή ζώα κανονικά 12-16 ώρες μετά τη χορήγηση. Χρειάζεται εν γένει μία πρόσθετη πρόωμη δειγματοληψία (κανονικά 2-4 ώρες μετά την αγωγή) εκτός κι αν υπάρχει σαφής θετική απόκριση στις 12-16 ώρες. Εντούτοις, μπορούν να γίνουν δειγματοληψίες σε εναλλακτικά χρονικά διαστήματα εφόσον τούτο αιτιολογείται με βάση τοξικοκινητικά δεδομένα.

Βραχυπρόθεσμες καλλιέργειες ηπατικών κυττάρων θηλαστικών παρασκευάζονται συνήθως εγχύοντας επιτοπίως στο ήπαρ κολλαγενάση και αφήνοντας τα προσφάτως διασταθέντα ηπατικά κύτταρα να προσκολληθούν σε κατάλληλη επιφάνεια. Τα ηπατικά κύτταρα από αρνητικούς μάρτυρες θα πρέπει να εμφανίζουν βιωσιμότητα (5) τουλάχιστον 50%.

1.5.7. Προσδιορισμός της UDS

Προσφάτως απομονωθέντα ηπατικά κύτταρα θηλαστικών επωάζονται συνήθως σε μέσο που περιέχει ³H-TdR για κατάλληλο χρονικό διάστημα, π.χ. 3-8 ώρες. Στο τέλος της περιόδου επώσεως, το μέσο πρέπει να απομακρύνεται από τα κύτταρα τα οποία μπορούν κατόπιν να επωαστούν σε μέσο που περιέχει περίσσεια μη επισημασμένης θυμιδίνης για να μειωθεί η μη ενσωματωμένη ραδιενέργεια ("cold chase"). Τα κύτταρα κατόπιν εκπλένονται, στερεώνονται και ξηραίνονται. Για μεγαλύτερους χρόνους επώσεως, μπορεί να μη χρειάζεται η φάση της "cold chase". Οι αντικειμενοφόροι πλάκες βυθίζονται σε αυτοακτινογραφικό γαλάκτωμα, εκτίθενται στο σκοτός (π.χ. ψύχονται για 7-14 ημέρες), αναπτύσσονται, χρωματίζονται και μετρούνται οι εκτεθειμένοι κόκκοι αργύρου. Για κάθε ζώο ετοιμάζονται δύο έως τρεις αντικειμενοφόροι πλάκες.

1.5.8. Ανάλυση

Τα αντικειμενοφόρα παρασκευάσματα θα πρέπει να περιέχουν ικανό αριθμό κυττάρων κανονικής μορφολογίας για να μπορεί να γίνει σημαντική εκτίμηση της UDS. Τα παρασκευάσματα εξετάζονται με μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν υπάρχουν σημάδια έκδηλης κυτταροτοξικότητας (π.χ. πύκνωση, μειωμένα επίπεδα ραδιοεπισημάνσης).

Οι αντικειμενοφόροι θα πρέπει να λαμβάνουν ένα κωδικό πριν από την καταμέτρηση των κόκκων. Κανονικά μετρούνται 100 κύτταρα από κάθε ζώο από δύο τουλάχιστον αντικειμενοφόρους πλάκες. Τυχόν καταμέτρηση λιγότερων των 100 κυττάρων/ζώο θα πρέπει να αιτιολογείται. Για τους πυρήνες S-φάσεως δεν μετρείται ο αριθμός κόκκων, μπορεί όμως να καταγραφεί η αναλογία των κυττάρων S-φάσεως.

Η ποσότητα της ενσωματωμένης ³H-TdR στους πυρήνες και το κυτταρόπλασμα μορφολογικώς κανονικών κυττάρων, όπως δεικνύεται από την εναπόθεση κόκκων αργύρου, θα πρέπει να προσδιορίζεται με κατάλληλες μεθόδους.

Προσδιορίζεται ο αριθμός κόκκων στους πυρήνες (πυρηνικοί κόκκοι, NG) και στις πυρηνοϊσοδύναμες περιοχές στο κυτταρόπλασμα (κυτταροπλασματικοί κόκκοι, CG). Οι CG μετρίονται είτε από την ισχυρότερα επισημασμένη περιοχή του κυτταροπλάσματος, είτε από το μέσο όρο δύο ή τριών τυχαίων αριθμών κυτταροπλασματικών κόκκων κοντά στον πυρήνα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες μέθοδοι καταμέτρησης (π.χ. καταμέτρηση σε ολόκληρο το κύτταρο) εφόσον υπάρχει κατάλληλη αιτιολόγηση (6).

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Θα πρέπει να δίνονται επιμέρους αποτελέσματα για κάθε αντικειμενοφόρο και κάθε ζώο. Επιπλέον, όλα τα δεδομένα θα πρέπει να συνοψίζονται με τη μορφή πίνακα. Ο αριθμός των καθαρών πυρηνικών κόκκων (NNG) θα πρέπει να υπολογίζεται για κάθε κύτταρο, για κάθε ζώο και για κάθε δόση και χρονική στιγμή αφαιρώντας τον αριθμό των CG από τον αριθμό των NG. Εφόσον μετρηθούν τα "κύτταρα σε επιδιόρθωση", θα πρέπει τα κριτήρια για τον ορισμό των "κυττάρων σε επιδιόρθωση" να αιτιολογούνται και να στηρίζονται σε προϋπάρχοντα ή παράλληλα στοιχεία αρνητικών μαρτύρων. Αριθμητικά αποτελέσματα μπορούν να εξαχθούν με στατιστικές μεθόδους. Εφόσον χρησιμοποιούνται, οι στατιστικές δοκιμές θα πρέπει να επιλέγονται και να αιτιολογούνται πριν από τη διεξαγωγή της έρευνας.

2.2. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Παραδείγματα κριτηρίων για αποκρίσεις θετικές/αρνητικές είναι τα ακόλουθα:

- | | | |
|-----------|------|--|
| θετικές | (i) | τιμές NNG μεγαλύτερες ενός προκαθορισμένου κατώτερου ορίου που αιτιολογείται με βάση εργαστηριακά προϋπάρχοντα δεδομένα, |
| ή | (ii) | τιμές NNG σημαντικά μεγαλύτερες από του παράλληλου μάρτυρα, |
| αρνητικές | (i) | τιμές NNG μέσα ή κάτω από τα προϋπάρχοντα δεδομένα για το κατώτερο όριο μάρτυρα, |
| ή | (ii) | τιμές NNG μη σημαντικά μεγαλύτερες από τον παράλληλο μάρτυρα. |

Θα πρέπει να εξετάζεται η βιολογική σχετικότητα των δεδομένων, δηλαδή θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι όπως η μεταξύ των ζώων διακύμανση, η σχέση δόσης-απόκρισης και η κυτταροτοξικότητα. Ως βοήθημα στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των δοκιμών μπορούν να χρησιμοποιούνται και στατιστικές μέθοδοι. Πάντως, σε μία θετική απόκριση, δεν θα πρέπει ως μοναδικός αποφασιστικός παράγοντας να λαμβάνεται η στατιστική σημαντικότητα.

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

Θετικά αποτελέσματα από τη δοκιμή USD με ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* δείχνουν ότι η υπό δοκιμή ουσία προκαλεί βλάβη στο DNA σε ηπατικά κύτταρα θηλαστικών *in vivo* που μπορεί να επιδιορθωθεί με μη προγραμματισμένη σύνθεση DNA *in vitro*. Αρνητικά αποτελέσματα δείχνουν ότι, υπό τις συνθήκες της δοκιμής, η υπό δοκιμή ουσία δεν προκαλεί βλάβη στο DNA που να μπορεί να ανιχνευθεί με τη δοκιμή αυτή.

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

3. ΑΝΑΦΟΡΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

ΕΚΘΕΣΗ ΔΟΚΙΜΗΣ

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Διαλύτης/φορέας:

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

Εξετασθέντα ζώα:

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

Συνθήκες δοκιμής:

- θετικοί και αρνητικοί (φορέα/διαλύτη) μάρτυρες,
- στοιχεία από τη μελέτη εύρεσης του εύρους, εφόσον έγινε,
- αιτιολογία επιλογής του επιπέδου δόσεως,
- λεπτομέρειες για την προετοιμασία της υπό δοκιμή ουσίας,
- λεπτομέρειες για τη χορήγηση της υπό δοκιμή ουσίας,
- αιτιολογία της επιλεγείσας οδού χορήγησης,
- μέθοδοι επαλήθευσης ότι η υπό δοκιμή ουσία έφθασε στη γενική κυκλοφορία ή στον ιστό στόχο, εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- μετατροπή της συγκέντρωσης (ppm) της υπό δοκιμή ουσίας στη διαίτα/πόσιμο νερό στην πραγματική δόση (mg/kg βάρους σώματος/ημέρα), εφόσον συντρέχει περίπτωση,
- λεπτομέρειες για την ποιότητα της τροφής και του νερού,
- λεπτομερής περιγραφή των σχημάτων αγωγής και δειγματοληψίας,
- μέθοδοι για τις μετρήσεις της τοξικότητας,
- μέθοδοι προετοιμασίας και καλλιέργειας των ηπατικών κυττάρων,
- χρησιμοποιηθείσα αυτοακτινογραφική τεχνική,

- αριθμός αντικειμενοφόρων πλακών και αριθμοί καταμετρηθέντων κυττάρων,
- κριτήρια αξιολόγησης,
- κριτήρια κατάταξης της δοκιμής ως θετικής, αρνητικής ή διαφορούμενης.

Αποτελέσματα:

- μέσες τιμές κατά αντικειμενοφόρο, ζώο και ομάδα για τους πυρηνικούς κόκκους, κυτταροπλασματικούς κόκκους και καθαρούς πυρηνικούς κόκκους,
- σχέση δόσης-απόκρισης, όπου είναι δυνατό,
- στατιστικές εκτιμήσεις, εφόσον υπάρχουν,
- σημάδια τοξικότητας,
- παράλληλα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) και θετικούς μάρτυρες,
- προϋπάρχοντα στοιχεία για τους αρνητικούς (διαλύτης/φορέας) μάρτυρες, με εύρη, μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις,
- αριθμό "κυττάρων σε επιδιόρθωση", εφόσον προσδιορίστηκε,
- αριθμό κυττάρων S-φάσεως, εφόσον προσδιορίστηκε,
- βιωσιμότητα των κυττάρων.

Εξέταση των αποτελεσμάτων.

Συμπεράσματα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp. 1—18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123—133.
- (3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52—77.
- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, *Mutations Res.*, 312, pp. 263—285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21—27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen*, 4, pp. 553—562.»

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 5

SV:

3.2.3. Farligt

R65 Farligt: kan ge lungskador vid förtäring.

Flytande ämnen och beredningar som på grund av sin låga viskositet utgör en fara för människa vid aspiration

a) För ämnen och beredningar som innehåller alifatiska, alicykliska och aromatiska kolväten i en total koncentration av 10 % eller mer och

- har en flödestid mindre än 30 sekunder, uppmätt med en 3 mm utloppsbägare enligt ISO 2431, eller
- har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, uppmätt med en kalibrerad kapillärviskosimeter av glas, enligt ISO 3104 och ISO 3105, eller
- har en kinematisk viskositet lägre än 7×10^{-6} m²/s vid 40 °C, bestämd från rotationsviskosimetri enligt ISO 3219.

Ämnen och beredningar, som uppfyller dessa kriterier, behöver dock inte klassificeras om de har en genomsnittlig ytspänning högre än 33 mN/m vid 25 °C, uppmätt med en Noüy tensiometer eller enligt de testmetoder som finns beskrivna i bilaga V del A.5.

b) För ämnen och beredningar, baserat på praktiska erfarenheter från människa.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DA γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DE γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FI γλώσσα)

FI:

3.2.6.1 Ihon tulehtuminen

Seuraava vaaraa osoittava lauseka määräytyy alla esiteltävien perusteitten mukaan:

R38 Ärsyttää ihoa

— Aineet ja valmisteet aiheuttavat ihon merkittävän tulehtumisen enintään neljän tunnin altistuksessa määritettynä kanilla liitteessä V mainitulla ihoärsyttestillä. Tulehdus kestää vähintään 24 tuntia.

Ihon tulehdus on merkittävää, jos:

- a) punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo laskettuna kaikista koe-eläimistä on vähintään 2;
- b) tai kun liitteessä V tarkoitettua testiä on täydennetty käyttämällä kolmea koe-eläintä, vähintään kahden koe-eläimen ihon punoituksen ja ruvenmuodostuksen tai turvotuksen voimakkuutta kuvaavien lukuarvojen keskiarvo on, jokaiselle koe-eläimelle laskettuna erikseen, vähintään 2.

Kummassakin tapauksessa keskiarvojen lasekmiseen on käytettävä kaikkia niitä lukuarvoja, jotka saadaan arvioitaessa vaikutusta 24 tunnin, 48 tunnin ja 72 tunnin välein.

Tulehdusta pidetään myös merkittävänä, jos ihon tulehtuminen jatkuu ainakin kahdella koe-eläimellä havainnointiajan päättymiseen asti. Erityiset vaikutukset kuten esimerkiksi hyperplasia, hilseileminen, värin muutokset, halkeamat, ruvet ja karvojenlähtö on otettava huomioon.

Tähän liittyviä tietoja voidaan saada myös eläimillä tehtävistä ei-akuuttisista altistuskokeista (katso lauseketta R48 koskevat huomautukset jaksossa 2.d). Vaikutuksia pidetään merkittävänä, jos ne vastaavat edellä kuvattuja vaikutuksia.

- Aineet ja valmisteet, jotka aiheuttavat ihmisillä merkittävää ihotulehdusta, kun kosketus on ollut välitön, jatkuva tai toistuva.
- Orgaaniset peroksidit, paitsi jos on olemassa näyttöä siitä, että tällaista vaikutusta ei ole.

Tuntoharha ('paresthesia'):

Pyretroiditorjunta-aineen ihokosketuksen aiheuttamaa tuntoharhaa ihmisessä ei pidetä ärsytysvaikutuksena, joka oikeuttaisi luokituksen Xi; R38. S-lauseketta S24 on kuitenkin sovellettava aineisiin, joilla on tällainen vaikutus.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DA γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DE γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά τη SV γλώσσα)

Σεο σημείο 6.2 (Οδηγίες ασφαλούς χρήσης για ουσίες και παρασκευάσματα):

DE:

S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abwaschen (vom Hersteller anzugeben)

- Anwendungsbereich:
 - sehr giftige, giftige oder ätzende Stoffe und Zubereitungen;
- Verwendung:
 - *obligatorisch* für sehr giftige Stoffe und Zubereitungen;
 - empfohlen für sonstige obengenannte Stoffe und Zubereitungen, insbesondere, wenn Wasser nicht die geeignete Spülflüssigkeit ist;
 - empfohlen für ätzende Stoffe und Zubereitungen, die an die allgemeine Öffentlichkeit abgegeben werden.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DA γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FI γλώσσα)

(Δεν αφορά τη SV γλώσσα)

FI:

S 29 Ei saa tyhjentää viemäriin

— Soveltamisala:

- erittäin helposti syttyvät tai helposti syttyvät veteen sekoittumattomat nesteet,
- erittäin myrkylliset tai myrkylliset aineet ja valmisteet,
- ympäristölle vaaralliset aineet.

— Käytön perusteet:

- *pakollinen* yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville ympäristölle vaarallisille ja tunnuksella N luokitelluille aineille, jollei kyseessä ole aineen tarkoitettu käyttö,
- suositeltava yleisessä kulutuksessa todennäköisesti käytettäville muille edellä mainituille aineille tai valmisteille, jollei kyseessä ole kemikaalin tarkoitettu käyttö.

(Δεν αφορά την ES γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DA γλώσσα)

(Δεν αφορά τη DE γλώσσα)

(Δεν αφορά την EL γλώσσα)

(Δεν αφορά την EN γλώσσα)

(Δεν αφορά τη FR γλώσσα)

(Δεν αφορά την IT γλώσσα)

(Δεν αφορά την NL γλώσσα)

(Δεν αφορά την PT γλώσσα)

(Δεν αφορά τη SV γλώσσα)

—

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 6

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΧ

ΜΕΡΟΣ Α

Διατάξεις σχετικά με συστήματα ασφαλείας για παιδιά

Εκτός των διατάξεων του άρθρου 22 παράγραφος 1 στοιχείο ε) της παρούσας οδηγίας, δοχεία κάθε χωρητικότητας που περιέχουν ουσίες παρουσιάζουσες κινδύνους εισπνοής (Χη· R 65) και ταξινομημένες και επισημασμένες σύμφωνα με το σημείο 3.2.3 του παραρτήματος VI της παρούσας οδηγίας, με εξαίρεση τις ουσίες που διατίθενται στην αγορά υπό μορφή αεροζόλ ή σε δοχεία εφοδιασμένα με σφραγισμένο σύνδεσμο ψεκασμού (spray), θα πρέπει να είναι εφοδιασμένα με συστήματα ασφαλείας για παιδιά.

1. Επανακλειόμενες συσκευασίες

Τα συστήματα ασφαλείας για παιδιά που χρησιμοποιούνται σε επανακλειόμενες συσκευασίες θα συμμορφούνται με την προδιαγραφή ISO 8317 (έκδοση 1 Ιουλίου 1989) σχετικά με "Συσκευασίες ασφαλείας για παιδιά — Απαιτήσεις και μέθοδοι δοκιμασίας για επανακλειόμενες συσκευασίες" που θεσπίστηκε από το Διεθνή Οργανισμό Προτύπων [International Standard Organization (ISO)].

2. Μη επανακλειόμενες συσκευασίες

Συστήματα ασφαλείας για παιδιά που χρησιμοποιούνται σε μη επανακλειόμενες συσκευασίες πρέπει να συμμορφούνται με την προδιαγραφή CEN EN 862 (έκδοση Μάρτιος 1997) σχετικά με "Συσκευασίες — Συσκευασίες ασφαλείας για παιδιά — Απαιτήσεις και μέθοδοι δοκιμασίας για μη επανακλειόμενες συσκευασίες, για μη φαρμακευτικά προϊόντα" που θεσπίστηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (CEN).

3. Παραρτηρήσεις

1. Η πιστοποίηση περί συμμόρφωσης με τις προαναφερόμενες προδιαγραφές πραγματοποιείται μόνο από εργαστήρια τα οποία είναι σύμφωνα με τη European Standards Series EN 45 000.

2. Ειδικές περιπτώσεις

Αν είναι προφανές ότι η συσκευασία είναι αρκετά ασφαλής για παιδιά εφόσον αυτά δεν μπορούν να φτάσουν στο περιεχόμενο χωρίς τη βήθεια εργαλείου, τότε δεν χρειάζεται εκτέλεση δοκιμασίας.

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις που όταν υπάρχουν αρκετές ενδείξεις περί αμφιβόλου ασφαλείας του κλεισίματος για παιδιά, η εθνική αρχή μπορεί να ζητήσει από το υπεύθυνο πρόσωπο, που διαθέτει στην αγορά το προϊόν, να της προσκομίσει πιστοποιητικό εργαστηρίου όπως περιγράφεται στο σημείο 3.1 στο οποίο βεβαιούται ότι το προϊόν είτε:

— φέρει τύπο κλεισίματος που δεν απαιτεί έλεγχο με βάση τις προδιαγραφές ISO και CEN που αναφέρονται παραπάνω

ή

— φέρει τύπο κλεισίματος που έχει ήδη δοκιμαστεί και ευρεθεί ότι είναι σύμφωνο με τις προαναφερόμενες προδιαγραφές.

ΜΕΡΟΣ Β

Διατάξεις σχετικά με ανάγλυφες προειδοποιητικές ενδείξεις

Οι τεχνικές προδιαγραφές για ανάγλυφες προειδοποιητικές ενδείξεις πρέπει να συμμορφούνται με την προδιαγραφή EN ISO 11683 (έκδοση 1997) σχετικά με "Συσκευασίες — Ανάγλυφες ενδείξεις κινδύνου — Απαιτήσεις".»

ΟΔΗΓΙΑ 2000/33/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 25ης Απριλίου 2000

σχετικά με την προσαρμογή, για εικοστή έβδομη φορά, στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικινδύνων ουσιών (*)

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΟΔΗΓΙΑ:

Έχοντας υπόψη:

Άρθρο 1

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

Τα κείμενα στα παραρτήματα I και II της παρούσας οδηγίας προστίθενται στο μέρος Β του παραρτήματος V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ.

την οδηγία 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 27ης Ιουνίου 1967, περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν στην ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικινδύνων ουσιών⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 1999/33/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽²⁾, και ιδίως το άρθρο 28,

Άρθρο 2

1. Τα κράτη μέλη θέτουν σε ισχύ τις νομοθετικές, κανονιστικές και διοικητικές διατάξεις που είναι απαραίτητες προκειμένου να συμμορφωθούν προς την παρούσα οδηγία έως την 1η Οκτωβρίου 2001 το αργότερο. Ενημερώνουν την Επιτροπή σχετικά.

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

Τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε οι διατάξεις που θεσπίζουν σχετικά να περιέχουν ή να συνοδεύονται από παραπομπή στην παρούσα οδηγία κατά την επίσημη δημοσίευσή τους. Τα κράτη μέλη καθορίζουν την μορφή της ως άνω αναφοράς.

(1) Επιβάλλεται να προσαρμοστεί στην τεχνική πρόοδο το παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ για τον καθορισμό των μεθόδων προσδιορισμού των φυσικο-χημικών ιδιοτήτων, της τοξικότητας και της οικοτοξικότητας των ουσιών και των σκευασμάτων.

2. Τα κράτη μέλη κοινοποιούν στην Επιτροπή τις κύριες διατάξεις της εθνικής νομοθεσίας που θεσπίζουν στον τομέα της παρούσας οδηγίας παρέχοντας παράλληλα πίνακα συχετισμού μεταξύ των διατάξεων της οδηγίας και των αντιστοίχως θεσπιζόμενων εθνικών διατάξεων.

(2) Το άρθρο 7 παράγραφος 2 της οδηγίας 86/609/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 24ης Νοεμβρίου 1986, για την προσέγγιση των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων των κρατών μελών σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς⁽³⁾, προβλέπει ότι δεν εκτελούνται πειράματα με πειραματόζωα εφόσον το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα δύναται να επιτευχθεί με άλλη επιστημονικά αποδεκτή μέθοδο που είναι εύλογα και πρακτικά διαθέσιμη.

Άρθρο 3

Η παρούσα οδηγία αρχίζει να ισχύει την τρίτη ημέρα από τη δημοσίευσή της στην *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*.

(3) Έχουν αναπτυχθεί εναλλακτικές πειραματικές μέθοδοι που δεν περιλαμβάνουν τη χρήση ζώων για τον έλεγχο των χημικών. Αυτές οι μέθοδοι θα πρέπει να εισαχθούν στο παράρτημα V της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ.

Άρθρο 4

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

(4) Τα μέτρα που προβλέπει η παρούσα οδηγία είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής για την προσαρμογή στην τεχνική πρόοδο των οδηγιών που σχετίζονται με την εξάλειψη των τεχνικών φραγμών στο εμπόριο επικινδύνων ουσιών και παρασκευασμάτων,

Βρυξέλλες, 25 Απριλίου 2000.

Για την Επιτροπή
Margot WALLSTRÖM
Μέλος της Επιτροπής

(*) Εκδόθηκε πριν την εικοστή έκτη προσαρμογή.

⁽¹⁾ ΕΕ 196 της 16.8.1967, σ. 1.

⁽²⁾ ΕΕ L 199 της 30.7.1999, σ. 57.

⁽³⁾ ΕΕ L 358 της 18.12.1986, σ. 1.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

«B.40. ΔΙΑΒΡΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1. Εισαγωγή

Το Ευρωπαϊκό Κέντρο Επικύρωσης Εναλλακτικών Μεθόδων (ΕΚΕΕΜ, Κοινό Κέντρο Ερευνών, Ευρωπαϊκή Επιτροπή) έχει εγκρίνει ως επιστημονικά έγκυρες δύο *in vitro* δοκιμές δερματικής διαβρωτικότητας, τη δοκιμασία διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER — transcutaneous electrical resistance) δέρματος επίμυος και δοκιμή που χρησιμοποιεί ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος (1) (2) (3). Η μελέτη επικύρωσης του ΕΚΕΕΜ κατέδειξε ότι και οι δύο δοκιμές είναι σε θέση να διακρίνουν με αξιόπιστο τρόπο γνωστές διαβρωτικές από μη διαβρωτικές ουσίες του δέρματος. Πέραν τούτου, το πρωτόκολλο της δοκιμής με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος, επέτρεψε ορθή διάκριση μεταξύ των διαφόρων βαθμών διαβρωτικών επιδράσεων (γνωστά ισχυρά διαβρωτικά του δέρματος, R35, και άλλα διαβρωτικά του δέρματος R34) (2). Η περιγραφή των δύο μεθόδων και η διαδικασία της δοκιμής παρέχονται κατωτέρω. Η επιλογή της μεθόδου γίνεται με βάση τις ειδικές απαιτήσεις και τις προτιμήσεις του χρήστη.

Βλέπε επίσης γενική εισαγωγή μέρος Β.

1.2. Ορισμοί

Διάβρωση του δέρματος: είναι η πρόκληση μη αντιστρεπτής βλάβης στο δερματικό ιστό μετά την εφαρμογή ελεγχόμενης ουσίας.

1.3. Ουσίες αναφοράς

Ουδεμία, αλλά βλέπε σημεία 1.5.3.4 και 1.7.2.3.

1.4. Αρχή της μεθόδου — Δοκιμασία διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) δέρματος επίμυος

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται επί 24 ώρες κατ' ανώτατο όριο στις επιδερμικές επιφάνειες δίσκων δέρματος που έχουν ληφθεί από τις δορές νεαρών επιμύων οι οποίοι έχουν θανατωθεί με μη βάνουσο τρόπο. Τα διαβρωτικά υλικά προσδιορίζονται βάσει της ικανότητάς τους να προκαλούν απώλεια της ακεραιότητας της κερατίνης στιβάδας και της φρακτικής λειτουργίας, η οποία μετράται ως μείωση της εγγενούς διαδερμικής ηλεκτρικής αντίστασης (TER) σε επίπεδα χαμηλότερα ενός κατώτατου ορίου (5 kΩ) (4) (5). Ερεθιστικά και μη ερεθιστικά υλικά δεν προκαλούν μείωση της TER σε επίπεδα χαμηλότερα του κατώτατου ορίου. Στη διαδικασία της δοκιμής μπορεί να ενσωματωθεί ένα στάδιο δέσμωσης χρωστικής για τις τασιενεργές ουσίες και τις ουδέτερες οργανικές ενώσεις (για τους ορισμούς βλέπε υποσημείωση 6) ώστε να μειωθεί ο αριθμός των ψευδοθετικών αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με χημικές ουσίες αυτού του τύπου συγκεκριμένα (2) (7).

1.5. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής — δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

1.5.1. Πειραματόζωα

Για την προετοιμασία των δίσκων δέρματος απαιτούνται νεαροί (20-23 ημερών) επίμυες (στέλεχος Wistar ή παρόμοιο). Αφαιρείται επιμελώς το τρίχωμα από την περιοχή της ράχης και των πλευρών με μικρή ξυριστική μηχανή για ζώα. Τα πειραματόζωα εκπλύνονται και σφουγγίζονται επιμελώς ενώ η περιοχή εμβαπτίζεται σε αντιβιοτικό διάλυμα (που περιέχει, επί παραδείγματι, στρεπτομικίνη, πενικιλίνη, χλωραμφαινικόλη ή αμφοτερικίνη, σε κατάλληλες συγκεντρώσεις για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης). Τα πειραματόζωα εκπλύνονται εκ νέου με αντιβιοτικά την τρίτη ή τέταρτη ημέρα με την πρώτη έκπλυση και χρησιμοποιούνται εντός τριών ημερών (η ηλικία των πειραματόζωων δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 31 ημέρες για την προετοιμασία της δοράς).

1.5.2. Προετοιμασία των δίσκων δέρματος

Τα πειραματόζωα θανατώνονται με μη βάνουσο τρόπο. Αφαιρείται το δέρμα από τη ράχη κάθε ζώου και απαλλάσσεται από την περίσσεια λίπους με προσεκτική απομάκρυνσή του από το δέρμα. Η δορά τοποθετείται επάνω από το άκρο σωλήνα πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE) με τρόπο ώστε η επιφάνεια της επιδερμίδας να βρίσκεται σε επαφή με το σωλήνα. Το δέρμα συγκρατείται στη θέση του με τη βοήθεια ελαστικού δακτυλίου Ο ο οποίος στερεώνεται με πίεση στο άκρο του σωλήνα, ενώ η περίσσεια ιστών αποκόπτεται. Οι διαστάσεις του σωλήνα και του δακτυλίου παρέχονται στο σχήμα 1. Στη συνέχεια, η ένωση του ελαστικού δακτυλίου Ο με το άκρο του σωλήνα PTFE στεγανοποιείται με τη βοήθεια βαζελίνης Ο σωλήνας στηρίζεται με ελατηριωτό σφιγκτήρα ενός υποδοχέα που περιέχει διάλυμα θεικού μαγνησίου (154 mM) (σχήμα 2).

1.5.3. Διαδικασία δοκιμής

1.5.3.1. Εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού

Οι υγρές ελεγχόμενες ουσίες (150 μl) εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια που βρίσκεται στο εσωτερικό του σωλήνα (σχήμα 2). Όταν εξετάζονται στερεά υλικά, εφαρμόζεται επαρκής ποσότητα στερεού υλικού στο δίσκο ώστε να καλύπτεται το σύνολο της επιφάνειας της επιδερμίδας. Στη συνέχεια, 150 μl απιονισμένου νερού προστίθενται στο στερεό υλικό και οι σωλήνες αναδεύονται ήπια. Οι ελεγχόμενες ουσίες πρέπει να είναι σε μέγιστη δυνατή επαφή με το δέρμα. Για ορισμένα στερεά αυτό μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση στους 30 °C κατ' ανώτατο όριο και τήξη της ελεγχόμενης ουσίας ή με άλεσμα ώστε να ληφθεί κοκκοποιημένο υλικό ή σκόνη.

Για κάθε ελεγχόμενη ουσία χρησιμοποιούνται τρεις δίσκοι δέρματος. Οι ελεγχόμενες ουσίες διατηρούνται σε επαφή με το δέρμα επί 24 ώρες (βλέπε επίσης 1.5.3.4). Στη συνέχεια εκπλύνονται με εκτόξευση τρεχούμενου νερού θερμοκρασίας έως 30 °C έως ότου απομακρυνθούν πλήρως. Η απομάκρυνση ελεγχόμενων ουσιών που έχουν στερεοποιηθεί στο εσωτερικό του σωλήνα είναι δυνατόν να διευκολυνθεί με εκτόξευση θερμού νερού θερμοκρασίας 30 °C περίπου.

1.5.3.2. Μετρήσεις TER

Η TER μετράται με τη βοήθεια γέφυρας δεδομένων (databridge) που λειτουργεί με εναλλασσόμενο ρεύμα και χαμηλή τάση (π.χ. AIM 401 ή 6401 ή αντίστοιχη). Πριν από τη μέτρηση της ηλεκτρικής αντίστασης, ελατώνεται η επιφανειακή τάση του δέρματος με την προσθήκη αιθανόλης 70 % στην ποσότητα που απαιτείται για να καλυφθεί η επιδερμίδα. Λίγα λεπτά αργότερα, ο σωλήνας αντιστρέφεται για να απομακρυνθεί η αιθανόλη και ο ιστός ενυδατώνεται με την προσθήκη 3 ml διαλύματος θεικού μαγνησίου (154 mM). Τα ηλεκτρόδια της γέφυρας δεδομένων τοποθετούνται σε μια από τις δύο πλευρές του δίσκου δέρματος για τη μέτρηση της αντίστασης σε kΩ/δίσκο δέρματος (σχήμα 2). Οι διαστάσεις των ηλεκτροδίων και το μήκος του ηλεκτροδίου που βρίσκεται κάτω από τους σφιγκτήρες τύπου κροδοδείλου παρέχονται στο σχήμα 1. Ο σφιγκτήρας του εσωτερικού (χονδρού) ηλεκτροδίου τοποθετείται στην κορυφή του σωλήνα PTFE κατά τη μέτρηση της αντίστασης ώστε να εξασφαλίζεται η εμφύσηση σταθερού τμήματος του ηλεκτροδίου στο διάλυμα θεικού μαγνησίου. Το εξωτερικό (λεπτό) ηλεκτρόδιο τοποθετείται εντός του υποδοχέα με τρόπο ώστε να ακουμπάει στον πυθμένα του. Η απόσταση μεταξύ βάσης του ελιπηρωτού σφιγκτήρα και της βάσης του σωλήνα PTFE διατηρείται σταθερή (σχήμα 1) δεδομένου ότι επηρεάζει τη λαμβανόμενη τιμή της αντίστασης.

Σημειώνεται ότι αν η μετρούμενη τιμή της αντίστασης υπερβαίνει τα 20 kΩ, αυτό μπορεί να οφείλεται στην ελεγχόμενη ουσία που επικαλύπτει την επιδερμική επιφάνεια του δίσκου δέρματος. Μπορεί να επιχειρηθεί απομάκρυνση της ουσίας αυτής με ανάδευση του σωλήνα PTFE επί 10 δευτερόλεπτα περίπου αφού καλυφθεί το στόμιό του με τον προστατευόμενο με γάντι αντίχειρα. Το διάλυμα θεικού μαγνησίου αποχύνεται και επαναλαμβάνεται η μέτρηση της αντίστασης με νέο διάλυμα θεικού μαγνησίου.

Οι μέσες μετρούμενες τιμές TER γίνονται αποδεκτές εφόσον οι σύγχρονες τους θετικές και αρνητικές τιμές που έχουν προκύψει για την ουσία μάρτυρα περικλείονται στις αποδεκτές για τη μέθοδο περιοχές ημών. Οι υποδεικνυόμενες ουσίες μάρτυρες και οι αντίστοιχες αποδεκτές περιοχές ημών ηλεκτρικής αντίστασης για τη περιγραφόμενη μεθοδολογία και συσκευή έχουν ως εξής:

Μάρτυρας	Ουσία	Πεδίο τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (kΩ)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ (36%) 10 M	0,5-1,0
Αρνητικός	Αποσταγμένο νερό	10-25

1.5.3.3. Τροποποιημένη διαδικασία για τασιενεργές ουσίες ουδέτερες οργανικές ενώσεις

Εάν οι τιμές TER ελεγχόμενων ουσιών που εμπίπτουν στην κατηγορία των τασιενεργών ουσιών ή των ουδέτερων οργανικών ενώσεων είναι μικρότερες από ή ίσες με 5 kΩ, μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτίμηση της διείσδυσης χρωστικής στους ιστούς. Με τη διαδικασία αυτή θα προσδιοριστεί κατά πόσο τα αποτελέσματα είναι ψευδοθετικά (2).

1.5.3.3.1. Εφαρμογή και απομάκρυνση της χρωματικής ουσίας σουλφοροδαμίνης Β

Μετά την αρχική κατεργασία με την ελεγχόμενη ουσία εφαρμόζονται στην επιδερμική επιφάνεια κάθε δίσκου δέρματος για δύο ώρες, 150 ml διαλύματος σουλφοροδαμίνης Β σε απεσταγμένο νερό 10 % (w/v). Στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος εκπλύνονται με εκτόξευση τρεχούμενου νερού θερμοκρασίας δωματίου επί 10 δευτερόλεπτα περίπου ώστε να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια ή αδέσμευτη χρωστική. Έκαστος των δίσκων δέρματος αφαιρείται από τον σωλήνα PTFE και τοποθετείται με φιαλίδιο (π.χ. γυάλινο φιαλίδιο σπινθηρισμού των 20 ml) που περιέχει απιονισμένο νερό (8 ml). Τα φιαλίδια αναδεύονται ήπια επί 5 λεπτά ώστε να απομακρυνθεί τυχόν επιπλέον περίσσεια ή αδέσμευτη χρωστική. Επαναλαμβάνεται η έκπλυση με τρεχούμενο νερό και, στη συνέχεια, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται και τοποθετούνται σε φιαλίδια που περιέχουν 5 ml διαλύματος δωδεκυλοσουλφονικού νατρίου (SDS) σε απεσταγμένο νερό 30 % (w/v). Τα φιαλίδια αφήνονται προς επώαση στους 60 °C επί μια νύχτα. Μετά την επώαση, οι δίσκοι δέρματος αφαιρούνται από τα φιαλίδια και απορρίπτονται ενώ το εναπομένον διάλυμα φυγοκεντρείται επί 8 λεπτά στους 21 °C (σχετική φυγόκεντρος δύναμη ~ 175). Από την υπερκείμενη στιβάδα λαμβάνεται 1 ml και αραιώνεται σε αναλογία 1 προς 5 (ω/ω) [δηλ. 1 ml+4 ml] με διάλυμα 30 % (w/v) SDS σε απεσταγμένο νερό. Η οπτική πυκνότητα του διαλύματος μετράται στα 565 nm περίπου.

1.5.3.3.2. Υπολογισμός της περιεκτικότητας σε χρωστική

Η περιεκτικότητα κάθε δίσκου σε σουλφοροδαμίνη Β υπολογίζεται με βάση τις τιμές οπτικής πυκνότητας (συντελεστής μοριακής απόσβεσης της σουλφοροδαμίνης Β στα 565 nm = $8,7 \times 10^4$ μοριακό βάρος = 580). Προσδιορίζεται η περιεκτικότητα εκάστου δίσκου δέρματος σε σουλφοροδαμίνη Β και κατόπιν υπολογίζεται η μέση περιεκτικότητα σε χρωστική για τις επαναλήψεις. Οι μέσες τιμές δέσμησης χρωστικής γίνονται αποδεκτές εφόσον οι σύγχρονες τιμές που έχουν προκύψει για την ουσία μάρτυρα περικλείονται στις αποδεκτές για τη μέθοδο περιοχές τιμών. Οι υποδεικνυόμενες αποδεκτές περιοχές τιμών περιεκτικότητας σε χρωστική για τις ουσίες μάρτυρες, για τη μεθοδολογία και για τη συσκευασία που περιγράφονται έχουν ως εξής:

Μάρτυρας	Ουσία	Περιοχή τιμών περεκτικότητων σε χρωστική/ (μg/δίσκο)
Θετικός	Υδροχλωρικό οξύ (36%) 10 M	40-100
Αρνητικός	Αποσταγμένο νερό	15-35

1.5.3.4. Πρόσθετες πληροφορίες

Οι ελεγχόμενες ουσίες μπορούν να εφαρμόζονται στους δίσκους δέρματος για βραχύτερα χρονικά διαστήματα (π.χ. 2 ώρες) προκειμένου να εντοπίζονται υλικά που προκαλούν ισχυρή διάβρωση. Η μελέτη επικύρωσης, ωστόσο, κατέδειξε ότι η δοκιμασία TER οδήγησε σε υπερεκτίμηση του διαβρωτικού δυναμικού διαφόρων ελεγχόμενων χημικών ουσιών μετά τη διατήρησή τους σε επαφή με τους δίσκους δέρματος επί δύο ώρες (2), ενώ με την εικοσιτετράωρη διαδικασία επέτρεψε τον ορθό προσδιορισμό των διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ουσιών.

Τα χαρακτηριστικά και οι διαστάσεις της χρησιμοποιούμενης συσκευής καθώς και η ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία μπορούν να επηρεάσουν τις λαμβανόμενες τιμές TER. Το κατώτατο όριο διάβρωσης των 5 kΩ υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα που ελήφθησαν με τη συγκεκριμένη συσκευή και διαδικασία που περιγράφονται στην παρούσα μέθοδο. Σε περίπτωση σημαντικής μεταβολής των συνθηκών της δοκιμής είναι δυνατόν να ισχύουν διαφορετικά όρια και τιμές για τους μάρτυρες. Ως εκ τούτου, συνιστάται διακρίβωση της μεθοδολογίας και του κατώτατου ορίου αντίστασης μέσω της διεξαγωγής δοκιμών με σειρά προτύπων διαλυμάτων αναφοράς τα οποία θα επιλεγούν μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης (3).

1.6. Αρχή της μεθόδου δοκιμής — Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

Το ελεγχόμενο υλικό εφαρμόζεται τοπικά επί 4 ώρες κατ' ανώτατο όριο, στο τρισδιάστατο ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος το οποίο περιλαμβάνει αναπλασθείσα επιδερμίδα με λειτουργική κερατίνη στοιβάδα. Τα διαβρωτικά υλικά ταυτοποιούνται με βάση την ικανότητά τους να προκαλούν μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας (όπως προσδιορίζεται π.χ. με τη δοκιμασία αναγωγής του MTT) σε επίπεδα χαμηλότερα των καθορισθέντων κατωτάτων ορίων σε συγκεκριμένες περιόδους έκθεσης. Η αρχή της δοκιμασίας στηρίζεται στο σκεπτικό ότι διαβρωτικές χημικές ουσίες είναι εκείνες που μπορούν να διεισδύσουν στην κερατίνη στοιβάδα (με διάχυση ή διάβρωση) και είναι ακούντως κυτταροτοξικές ώστε να προκαλούν το θάνατο των κυττάρων στις υποκείμενες κυτταρικές στοιβάδες.

1.7. Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής — Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

1.7.1. Ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος

Τα ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος είναι δυνατόν να προέρχονται από διάφορες πηγές, αλλά πρέπει να ικανοποιούν ορισμένα κριτήρια. Το ομοίωμα πρέπει να έχει μια λειτουργική κερατίνη στοιβάδα με υπόστρωμα ζώντων κυττάρων. Η φρακτική λειτουργία της κερατίνης στοιβάδας πρέπει να είναι επαρκής. Αυτό μπορεί να αποδειχθεί καταδεικνύοντας την ατοχή του ομοιώματος στην κυτταροτοξικότητα μετά την εφαρμογή ουσιών οι οποίες είναι γνωστές ως κυτταροτοξικές αλλά δεν διαπερνούν την κερατίνη στοιβάδα. Πρέπει επίσης να καταδεικνύεται ότι με το ομοίωμα αυτό λαμβάνονται αναπαραγωγίμα αποτελέσματα υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

Η βιωσιμότητα των ζώντων κυττάρων του ομοιώματος πρέπει να είναι αρκετά υψηλή ώστε να γίνεται σαφής διάκριση μεταξύ των θετικών και αρνητικών μαρτύρων. Η κυτταρική βιωσιμότητα (όπως προκύπτει, επί παραδείγματι, από τη μέτρηση των επιπέδων του αναχθέντος MTT, δηλαδή σε τιμή οπτικής πυκνότητας) μετά την έκθεση σε αρνητικό μάρτυρα πρέπει να εμπίπτει στα αποδεκτά όρια για το συγκεκριμένο ομοίωμα. Ομοίως, οι τιμές κυτταρικής βιωσιμότητας που λαμβάνονται με θετικό μάρτυρα (έναντι των αντίστοιχων που λαμβάνονται με αρνητικό μάρτυρα) πρέπει να βρίσκονται εντός καθορισμένων ορίων. Το χρησιμοποιούμενο προγνωστικό μοντέλο πρέπει να ανταποκρίνεται απαραίτητως στα διεθνή πρότυπα επικύρωσης (2).

1.7.2. Διαδικασία δοκιμής

1.7.2.1. Εφαρμογή του ελεγχόμενου υλικού

Προκειμένου για υγρά υλικά, χρησιμοποιείται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτει την επιφάνεια του δέρματος (τουλάχιστον 25 μl/cm²). Προκειμένου για στερεά υλικά, χρησιμοποιείται επαρκής ποσότητα ελεγχόμενης ουσίας ώστε να καλύπτει το δέρμα και στη συνέχεια η στερεά ουσία υγραίνεται για να εξασφαλιστεί καλή επαφή με το δέρμα. Εφόσον απαιτείται, τα στερεά κοινοποιούνται πριν από την χρησιμοποίησή τους. Η μέθοδος εφαρμογής πρέπει να είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών (2). Στο τέλος της περιόδου έκθεσης το ελεγχόμενο υλικό εκπλύνεται επιμελώς από την επιφάνεια του δέρματος με αλατούχο διάλυμα.

1.7.2.2. Μετρήσεις της κυτταρικής βιωσιμότητας

Για τη μέτρηση της κυτταρικής βιωσιμότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί οιαδήποτε επικυρωμένη ποσοτική μέθοδος. Η πλέον χρησιμοποιούμενη δοκιμασία είναι η αναγωγή MTT η οποία παρέχει ακριβή και αναπαραγωγίμα αποτελέσματα σε διάφορα εργαστήρια (2). Ο δίσκος δέρματος εμβαπτίζεται σε διάλυμα MTT συγκεντρώσεως 0,3 mg/ml στους 20-28 °C επί 3 ώρες. Το προκύπτον κυανούν ίζημα φορμαυαν εκχυλίζεται (εκχύλιση με διαλύτη) και η συγκέντρωση της φορμαυαν υπολογίζεται με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 545 και 595 nm.

1.7.2.3. Πρόσθετες πληροφορίες

Το είδος του χρησιμοποιηθέντος ομοιώματος δέρματος και το ακριβές πρωτόκολλο του χρόνου έκθεσης και των διαδικασιών έκπλυσης κ.λπ. επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τα σχετικά με την κυτταρική βιωσιμότητα αποτελέσματα. Συνιστάται διακρίβωση της μεθοδολογίας και του προγνωστικού μοντέλου μέσω της διεξαγωγής δοκιμών με σειρά προτύπων διαλυμάτων αναφοράς τα οποία επιλέγονται μεταξύ των χημικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη επικύρωσης του ΕΚΕΕΜ (3). Η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος είναι απαραίτητο να έχει αποδειχθεί αναπαραγώγιμη εντός και μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων για ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα. Η μέθοδος πρέπει να ανταποκρίνεται τουλάχιστον στα κριτήρια επιστημονικής επικύρωσης που καθορίζονται προηγουμένως (2) και τα αποτελέσματα της μελέτης επικύρωσης να δημοσιεύονται σε έγκυρο επιστημονικό περιοδικό του οποίου τα άρθρα εγκρίνονται από ομότιμους αξιολογητές.

2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

2.1.1. Δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

Οι τιμές ηλεκτρικής αντίστασης σε $k\Omega$ του ελεγχόμενου υλικού, των θετικών και αρνητικών μαρτύρων και τυχόν προτύπων χημικών ουσιών αναφοράς πρέπει να παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα, όπου θα περιλαμβάνονται επίσης δεδομένα για τα επαναληπτικά πειράματα, μέσες τιμές και η προκύπτουσα ταξινόμηση.

2.1.2. Δοκιμασία με ομοιώματα ανθρώπινου δέρματος

Οι τιμές οπτικής πυκνότητας και τα υπολογισθέντα δεδομένα εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας για το ελεγχόμενο υλικό, τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τυχόν πρότυπες χημικές ουσίες αναφοράς πρέπει να παρουσιάζονται υπό μορφή πίνακα, όπου περιλαμβάνονται επίσης δεδομένα για τα επαναληπτικά πειράματα, μέσες τιμές και η προκύπτουσα ταξινόμηση.

2.2. Αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

2.2.1. Δοκιμασία TER δέρματος επίμυος

Όταν η μέση τιμή TER που λαμβάνεται για την ελεγχόμενη ουσία υπερβαίνει τα $5 k\Omega$ τότε η συγκεκριμένη ουσία δεν θεωρείται διαβρωτική. Εάν η τιμή TER είναι μικρότερη ή ίση των $5 k\Omega$, η ελεγχόμενη ουσία θεωρείται διαβρωτική εφόσον δεν πρόκειται για τασιενεργό ουσία ή ουδέτερη οργανική ένωση.

Για τασιενεργές ουσίες ή ουδέτερες οργανικές ενώσεις για τις οποίες λαμβάνονται τιμές TER μικρότερες ή ίσες των $5 k\Omega$, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της διείσδυσης χρωστικής. Εάν η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική υπερβαίνει ή ισούται με την αντίστοιχη μέση περιεκτικότητα σε χρωστική που προκύπτει ταυτόχρονα για το θετικό μάρτυρα 36% υδροχλωρίο, τότε το λαμβανόμενο αποτέλεσμα για την ελεγχόμενη ουσία είναι πραγματικά θετικό και η ουσία εφρείται επομένως διαβρωτική. Εάν η μέση περιεκτικότητα του δίσκου σε χρωστική είναι μικρότερη από την αντίστοιχη μέση περιεκτικότητα σε χρωστική που προκύπτει ταυτόχρονα για το θετικό μάρτυρα 36% υδροχλωρίο, τότε το λαμβανόμενο αποτέλεσμα για την ελεγχόμενη ουσία είναι ψευδοθετικό και η ουσία δεν είναι επομένως διαβρωτική.

2.2.2. Δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπινου δέρματος

Η τιμή οπτικής πυκνότητας του αρνητικού μάρτυρα αντιπροσωπεύει κυτταρική βιωσιμότητα 100%. Ως εκ τούτου οι λαμβανόμενες για το ελεγχόμενο δείγμα τιμές οπτικής πυκνότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της εκατοστιαίας βιωσιμότητας σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Η διαχωριστική τιμή εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας βάσει της οποίας γίνεται διάκριση μεταξύ διαβρωτικών και μη διαβρωτικών ελεγχόμενων υλικών (ή μεταξύ των διαφόρων βαθμών διάβρωσης) πρέπει να καθορίζεται σαφώς στο προγνωστικό μοντέλο πριν από την επικύρωση της μεθόδου, και η πραγματοποιούμενη στη συνέχεια μελέτη επικύρωσης πρέπει να καταδεικνύει την καταλληλότητα της διαχωριστικής αυτής τιμής (2).

3. ΕΚΘΕΣΕΙΣ

'Έκθεση της δοκιμής

Η έκθεση της δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον τις ακόλουθες πληροφορίες:

Ελεγχόμενη ουσία:

— ταυτοποίηση, φυσική κατάσταση και, κατά περίπτωση, φυσικοχημικές ιδιότητες. Ανάλογες πληροφορίες πρέπει να παρέχονται για τις τυχόν χρησιμοποιούμενες ουσίες αναφοράς.

Συνθήκες δοκιμής:

— λεπτομερής περιγραφή της διαδικασίας δοκιμής που ακολουθήθηκε,
— περιγραφή και αιτιολόγηση τυχόν τροποποιήσεων.

Αποτελέσματα:

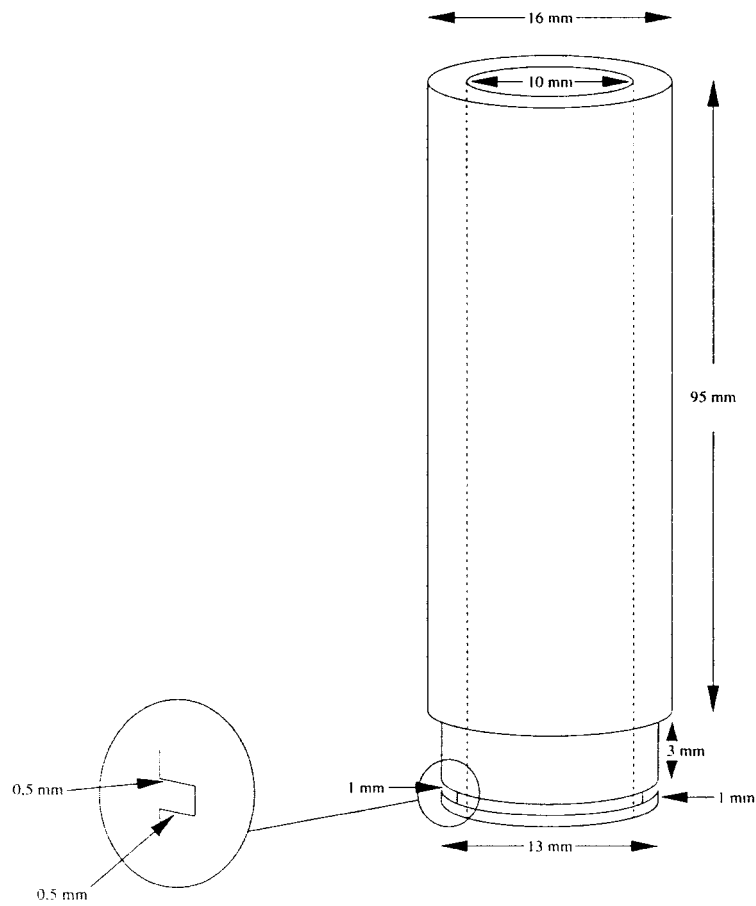
- παρουσίαση σε πίνακα των τιμών ηλεκτρικής αντίστασης (δοκιμασία TER) ή των τιμών εκατοστιαίας κυτταρικής βιωσιμότητας (δοκιμασία με ομοίωμα ανθρώπου δέρματος) που ελήφθησαν για το ελεγχόμενο υλικό, τους θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες και τυχόν πρότυπες χημικές ουσίες αναφοράς, συμπεριλαμβανομένων των δεδομένων που προέκυψαν από τη επαναληπτικά πειράματα και των μέσων τιμών,
- περιγραφή τυχόν άλλων επιπτώσεων που παρατηρήθηκαν.

Σχολιασμός των αποτελεσμάτων**Συμπεράσματα****4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

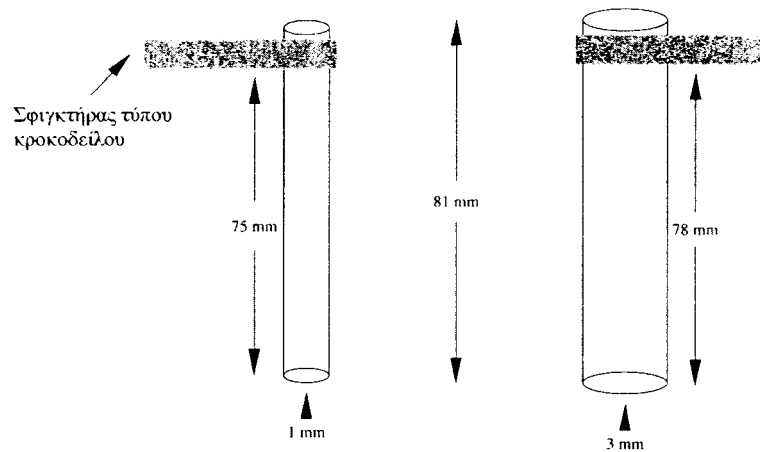
- (1) ECVAM (1998), ECVAM News & Views, *ATLA* 26, σσ. 275-280.
- (2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhtuter, H-G. & Liebsch, M. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, *Toxicology in Vitro* 12, σσ. 483-524.
- (3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, *Toxicology in Vitro* 12, σσ. 471-482.
- (4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test — modifications and validation, *Food & Chemical Toxicology* 24, σσ. 507-512.
- (5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, *Toxicology in Vitro* 6, σσ. 191-194.
- (6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, *ATLA* 26, σσ. 709-720.
- (7) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, *ATLA* 23, σσ. 219-255.

Σχήμα 1

Διαστάσεις του σωλήνα PTFE

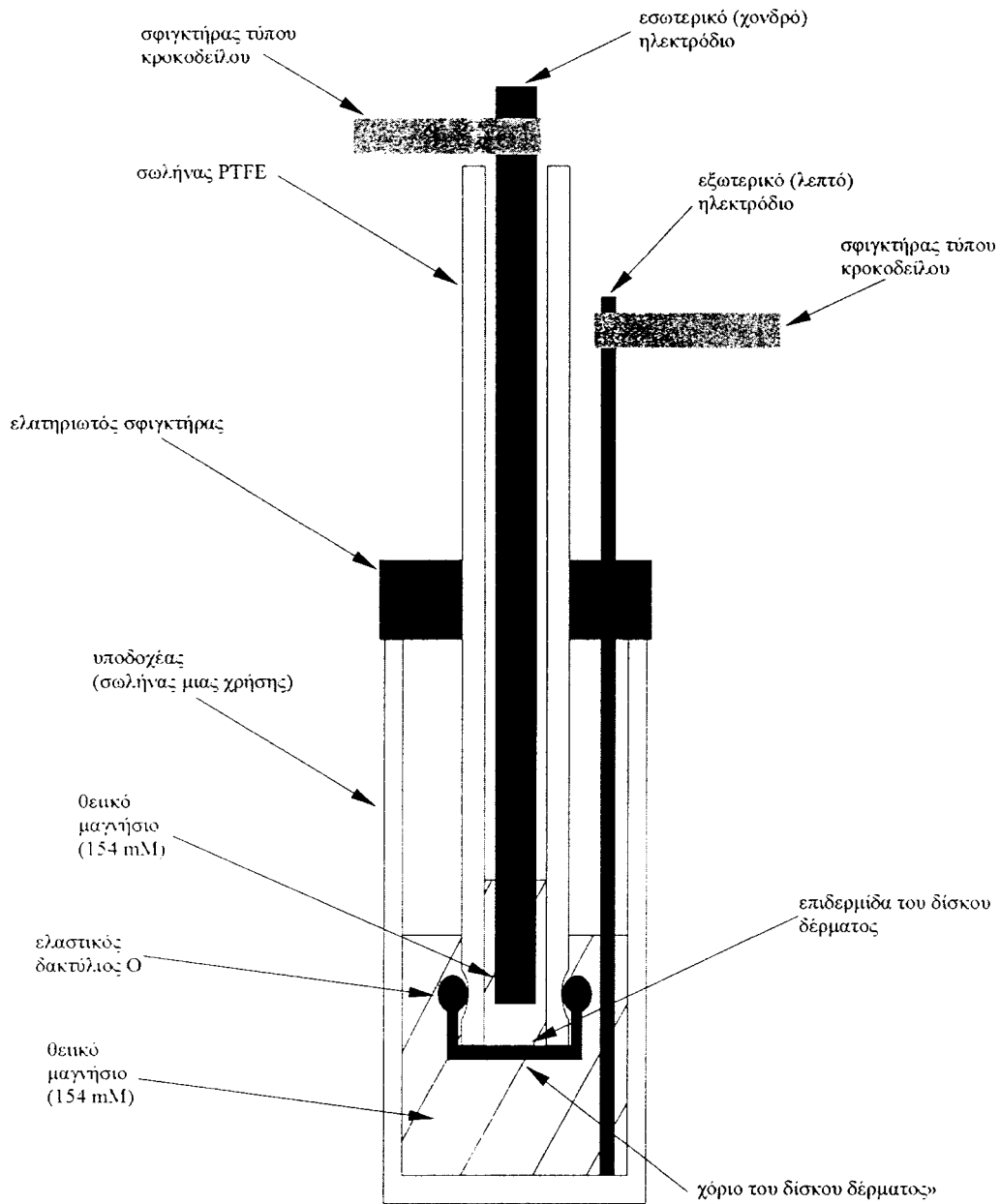


Διαστάσεις των ηλεκτροδίων



Σχήμα 2

Συσκευή για τη δοκιμασία TER δέρματος επίμονος



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

«B.41. ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ — IN VITRO 3T3 NRU ΔΟΚΙΜΗ ΦΩΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

1 ΜΕΘΟΔΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Ως φωτοτοξικότητα ορίζεται η τοξική απόκριση που εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως ή που επάγεται ομοίως από ακτινοβολία του δέρματος έπειτα από συστηματική χορήγηση μιας χημικής ουσίας.

Τα στοιχεία που λαμβάνονται από την in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας χρησιμεύουν για τον προσδιορισμό της φωτοτοξικής δυνατότητας μιας υπό δοκιμή ουσίας, δηλαδή της ύπαρξης ή απουσίας πιθανών κινδύνων που μπορεί να εμφανιστούν από μια υπό δοκιμή ουσία σε συνδυασμό με έκθεση στο υπεριώδες και το ορατό φως.

Δεδομένου ότι το τοξικολογικό τελικό αποτέλεσμα της in vitro δοκιμής είναι ο προσδιορισμός της φωτοκυτταροτοξικότητας, που προκαλείται από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και φωτός, ενώσεις που είναι φωτοτοξικές in vivo έπειτα από συστηματική εφαρμογή και κατανομή στο δέρμα, καθώς επίσης και ενώσεις που δρουν ως φωτοερεθιστικά έπειτα από τοπική εφαρμογή στο δέρμα, μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη δοκιμή.

Η in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σε κοινό πρόγραμμα ΕΕ/COLIPA από το 1992-1997 (123) που απέβλεπε στην καθιέρωση μιας έγκυρης in vitro εναλλακτικής λύσης αντί των διαφόρων in vivo χρησιμοποιούμενων δοκιμών. Το 1996 σε συνάντηση εργασίας του ΟΟΣΑ προτάθηκε μια in vitro προσέγγιση διαδοχικών σταδίων ελέγχου για την εκτίμηση της φωτοτοξικότητας (4).

Τα αποτελέσματα της in vitro 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας συγκρίθηκαν με τις in vivo οξείες φωτοτοξικές/φωτοερεθιστικές επιδράσεις σε ζώα και ανθρώπους, και η δοκιμή αποδείχθηκε ότι παρείχε εξαιρετικές προβλέψεις ως προς τις επιδράσεις αυτές. Η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί για την πρόβλεψη άλλων δυσμενών επιδράσεων που μπορεί να προκύψουν από τη συνδυασμένη δράση χημικής ουσίας και του φωτός, π.χ. φωτογονιδιοτοξικότητας, φωτοαλλεργίας και φωτοκαρκινογένεσης, αν και πολλές ουσίες που παρουσιάζουν τα ειδικά αυτά χαρακτηριστικά αντιδρούν θετικά στην in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας. Επιπλέον, η δοκιμή δεν έχει σχεδιαστεί κατά τρόπο που να μπορεί να γίνεται εκτίμηση της φωτοτοξικής ισχύος.

Στο προσάρτημα δίνεται μια προσέγγιση διαδοχικών σταδίων ελέγχου της φωτοτοξικότητας χημικών ουσιών.

1.2 Ορισμοί

Ένταση ακτινοβολίας: η ένταση του προσπίπτοντος σε μια επιφάνεια υπεριώδους (UV) ή ορατού φωτός, μετρούμενη σε W/m^2 ή mW/cm^2 .

Δόση φωτός: η ποσότητα (= ένταση × χρόνος) υπεριώδους (UV) ή ορατής ακτινοβολίας προσπίπτουσας σε επιφάνεια, εκφραζόμενη σε Joules (= $W \times s$) ανά μονάδα επιφάνειας, π.χ. J/m^2 ή J/cm^2 .

Ζώνες UV φωτός: οι χαρακτηρισμοί που προτείνονται από την CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) είναι: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) και UVC (100-280 nm). Χρησιμοποιούνται επίσης και ορισμένοι άλλοι χαρακτηρισμοί: το διαχωριστικό σημείο μεταξύ UVB και UVA τοποθετείται συνήθως στα 320 nm, ενώ η UVA μπορεί να χωρίζεται σε UV-A1 και UV-A2 με την υποδιαίρεση στα 340 nm περίπου.

Κυτταρική βιωσιμότητα: παράμετρος που μετράει τη συνολική δραστηριότητα ενός κυτταρικού πληθυσμού (π.χ. πρόσληψη της ζωτικής χρωστικής Neutral Red σε κυτταρικά λυσοσώματα) η οποία, ανάλογα με το μετρούμενο τελικό αποτέλεσμα και τον χρησιμοποιούμενο σχεδιασμό της δοκιμής, συσχετίζεται με το συνολικό αριθμό ή/και ζωτικότητα των κυττάρων.

Σχετική κυτταρική βιωσιμότητα: η κυτταρική βιωσιμότητα εκφραζόμενη σε σχέση με αρνητικούς (διαλύτες) μάρτυρες που έχουν περάσει από όλη τη διαδικασία δοκιμής (είτε +UV είτε -UV), αλλά δεν έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία με υπό δοκιμή ουσία.

Μοντέλο πρόβλεψης: αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων μιας δοκιμής τοξικότητας σε πρόβλεψη της τοξικής δυνατότητας. Στα πλαίσια των κατευθυντηρίων γραμμών της παρούσας δοκιμής, για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων της in vitro 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας σε πρόβλεψη των φωτοτοξικών δυνατοτήτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι PIF και MPE.

PIF (photo irritation factor — συντελεστής φωτοερεθισμού): συντελεστής που λαμβάνεται συγκρίνοντας δύο εξίσου αποτελεσματικές κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (EC_{50}) της υπό δοκιμή ουσίας απουσία (-UV) και παρουσία (+UV) μη κυτταροτοξικής ακτινοβολίας με UVA/ορατό φως.

MPE (mean photo effect — μέση φωτοεπίδραση): νέο μέτρο που προέρχεται από μαθηματική ανάλυση του πλήρους σχήματος δύο καμπύλων συγκέντρωσης απόκρισης απουσία (-UV) και παρουσία (+UV) μη κυτταροτοξικής ακτινοβολίας με UVA/ορατό φως.

Φωτοτοξικότητα: οξεία τοξική απόκριση που εμφανίζεται μετά την πρώτη έκθεση του δέρματος σε ορισμένες χημικές ουσίες και την εν συνεχεία έκθεση στο φως, ή η οποία επάγεται ομοίως από ακτινοβολία του δέρματος έπειτα από συστηματική χορήγηση μιας χημικής ουσίας.

Φωτοερεθισμός: υποδιαίρεση του όρου “φωτοτοξικότητα”, που χρησιμοποιείται για να περιγράψει μόνον τις φωτοτοξικές εκείνες αντιδράσεις που προκαλούνται στο δέρμα έπειτα από έκθεση σε χημικές ουσίες (τοπικά ή από το στόμα). Οι φωτοτοξικές αυτές αντιδράσεις έχουν πάντοτε ως αποτέλεσμα τη μη εξειδικευμένη καταστροφή κυττάρων (αντιδράσεις όπως τα ηλιακά εγκαύματα).

Φωτοαλλεργία: επίκτητη ανοσολογική αντίδραση, που δεν εμφανίζεται στην πρώτη επαφή με χημική ουσία και φως, και χρειάζεται επαγωγικό χρονικό διάστημα μιας ή δύο εβδομάδων πριν να εμφανιστεί δερματική αντίδραση.

Φωτογονιδιοτοξικότητα: παρατηρούμενη γονιδιοτοξική απόκριση με γενετικό τελικό αποτέλεσμα, που εμφανίζεται μετά την έκθεση κυττάρων σε μη γονιδιοτοξική δόση UV/ορατού φωτός και μη γονιδιοτοξική χημική ουσία.

Φωτοκαρκινογένεση: καρκινογένεση προκαλούμενη από επανειλημμένη χρήση φωτός και χημικής ουσίας. Εφόσον τυχόν από UV προκαλούμενη ογκογένεση ενισχύεται από χημική ουσία, τότε χρησιμοποιείται ο όρος “φωτοσυγκαρκινογένεση”.

1.3 Ουσίες αναφοράς

Εκτός από τον θετικό χημικό μάρτυρα χλωροπρομαζίνη, που θα πρέπει να δοκιμάζεται ταυτόχρονα σε κάθε δοκιμή, σε περιπτώσεις πρώτης εφαρμογής της δοκιμής φωτοτοξικότητας 3T3 NRU συνιστάται να χρησιμοποιούνται ως ουσίες αναφοράς και ορισμένες από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν σε διεργαστηριακές δοκιμές με την παρούσα δοκιμή (1) (3) (13).

1.4 Αρχικές θεωρήσεις

Υπάρχουν διάφοροι τύποι χημικών ουσιών που έχουν αναφερθεί ως φωτοτοξικές (5) (6) (7) (8). Το μόνο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να απορροφούν φωτεινή ενέργεια στη περιοχή του ηλιακού φωτός. Σύμφωνα με τον πρώτο νόμο της φωτοχημείας (Grotthaus-Draper's Law) η φωτοαντίδραση απαιτεί επαρκή απορρόφηση κβάντων φωτός. Έτσι, πριν από το βιολογικό έλεγχο σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της παρούσας δοκιμής, θα πρέπει να προσδιορίζεται το φάσμα απορρόφησης UV/ορατού της υπό δοκιμή ουσίας (π.χ. σύμφωνα με την OECD Test Guideline 101). Εάν ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης/απορρόφησης είναι μικρότερος από 10 λίτρα \times mol⁻¹ \times cm⁻¹ η χημική ουσία δεν έχει φωτοαντιδραστικές δυνατότητες και δεν χρειάζεται να ελεγχθεί με την in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας ή οποιαδήποτε άλλη βιολογική δοκιμή για δυσμενείς φωτοχημικές επιδράσεις (Προσάρτημα).

1.5 Αρχή της μεθόδου δοκιμής

Έχουν εντοπιστεί τέσσερις μηχανισμοί με τους οποίους η απορρόφηση φωτός από μια χρωμοφόρο χημική ένωση μπορεί να οδηγήσει σε φωτοτοξική απόκριση (7). Όλοι απολήγουν σε καταστροφή των κυττάρων. Συνεπώς, η in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας βασίζεται σε σύγκριση της κυτταροτοξικότητας μιας χημικής ουσίας όταν υποβάλλεται σε δοκιμή με και χωρίς έκθεση σε μη κυτταροτοξική δόση UVA/ορατού φωτός. Η κυτταροτοξικότητα σε αυτή τη δοκιμή εκφράζεται με τη μορφή εξαρτώμενης από τη συγκέντρωση μείωσης της πρόσληψης της ζωτικής χρωστικής neutral red (NR) (9), 24 ώρες μετά την αγωγή με την υπό δοκιμή ουσία και ακτινοβολία.

Κύτταρα Balb/c 3T3 διατηρούνται σε καλλιέργεια για 24 ώρες για το σχηματισμό μονοστιβάδων. Στη συνέχεια, δύο τρυβλία με 96 κοιλότητες ανά δοκιμαζόμενη ουσία προεπωάζονται με οκτώ διαφορετικές συγκεντρώσεις της ουσίας για 1 h. Στη συνέχεια, ένα από τα δύο τρυβλία εκτίθεται σε μη κυτταροτοξική δόση UVA/ορατού φωτός 5 J/cm² UVA (πείραμα +UV), ενώ το άλλο τρυβλίο διατηρείται στο σκοτάδι (πείραμα -UV). Και στα δύο τρυβλία, το μέσον αγωγής αντικαθίσταται κατόπιν από μέσον καλλιέργειας και έπειτα από 24 ακόμη ώρες επώασης, προσδιορίζεται η κυτταρική βιωσιμότητα neutral red uptake (NRU) για 3 h. Η σχετική κυτταρική βιωσιμότητα, εκφραζόμενη ως ποσοστό μη υποβληθέντων σε αγωγή αρνητικών μαρτύρων, υπολογίζεται για κάθε μία από τις οκτώ συγκεντρώσεις δοκιμής. Για την πρόβλεψη της φωτοτοξικής δυνατότητας, οι κατά συγκέντρωση αποκρίσεις που λαμβάνονται με (+UV) και χωρίς (-UV) ακτινοβολία συγκρίνονται, συνήθως στα επίπεδα EC₅₀, δηλαδή στη συγκέντρωση που αναστέλει την κυτταρική βιωσιμότητα κατά 50% σε σύγκριση με τους μη υποβληθέντες σε αγωγή μάρτυρες.

1.6 Ποιοτικά κριτήρια

Κυτταρική ευαισθησία σε UVA, ιστορικά στοιχεία: Τα κύτταρα θα πρέπει κανονικά να ελέγχονται ως προς την ευαισθησία τους σε UVA. Κύτταρα διασπείρονται υπό πυκνότητα που χρησιμοποιείται και στην in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας, την επόμενη ημέρα ακτινοβολούνται με δόσεις UVA από 1-9 J/cm², και η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται μια ημέρα αργότερα χρησιμοποιώντας τη δοκιμή NRU. Τα κύτταρα πληρούν τα κριτήρια ποιότητας, εάν η βιωσιμότητά τους μετά την ακτινοβολία με 5 J/cm² UVA δεν είναι μικρότερη από το 8% της βιωσιμότητας των διατηρηθέντων στο σκοτάδι μαρτύρων. Στη μέγιστη δόση UVA των 9 J/cm² η βιωσιμότητα δεν θα πρέπει να είναι μικρότερη από το 50% εκείνης των διατηρηθέντων στο σκοτάδι μαρτύρων. Ο έλεγχος αυτός θα πρέπει να επαναλαμβάνεται έπειτα από κάθε 10 περίπου διελεύσεις των κυττάρων.

Ευαισθησία στο UVA των αρνητικών κυτταρικών μαρτύρων τρέχουσα δοκιμή: Η δοκιμή πληροί τα ποιοτικά κριτήρια εάν οι αρνητικοί μάρτυρες (κύτταρα σε Earl's balanced salt solution (EBSS) με ή χωρίς 1% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) ή 1% αιθανόλη (EtOH)) στο +UVA πείραμα εμφανίζουν βιωσιμότητα όχι μικρότερη από το 8% εκείνης μη ακτινοβολημένων κυττάρων στον ίδιο διαλύτη του συμπαρομαρτούντος πειράματος στο σκοτάδι (-UVA).

Βιωσιμότητα αρνητικών μαρτύρων: Η απόλυτη οπτική πυκνότητα ($OD_{540 \text{ NRU}}$) μετρούμενη στο εκχύλισμα NP των αρνητικών μαρτύρων δείχνει αν τα 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα αναπτύχθηκαν με κανονικό χρόνο διπλασιασμού κατά τη διάρκεια των δύο ημερών της δοκιμής. Μια δοκιμή πληροί τα κριτήρια αποδοχής εάν η μέση $OD_{540 \text{ NRU}}$ των μη υποβληθέντων σε αγωγή μαρτύρων είναι $\geq 0,2$.

Θετικός μάρτυρας: Σε κάθε *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας πρέπει να εξετάζεται συγχρόνως και μια γνωστή φωτοτοξική χημική ουσία. Στη μελέτη επικύρωσης των ΕΕ/COLIPA ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε χλωροπρομαζίνη (CPZ) η οποία και επομένως προτείνεται. Στην περίπτωση CPZ που εξετάζεται με το τυπικό πρωτόκολλο στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας, ορίστηκαν τα ακόλουθα κριτήρια αποδοχής-δοκιμής: CPZ ακτινοβολημένη (+UVA): $EC_{50} = 0,1$ έως $2,0$ $\mu\text{g/ml}$, CPZ μη ακτινοβολημένη (-UVA): $EC_{50} = 7,0$ έως $90,0$ $\mu\text{g/ml}$. Ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF), δηλαδή η μεταβολή της EC_{50} θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 6.

Ως συμπαραομαρτώντες θετικοί μάρτυρες, αντί της (CPZ), μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες γνωστές φωτοτοξικές χημικές ουσίες, κατάλληλες για τη χημική τάξη ή τα χαρακτηριστικά διαλυτότητας της αξιολογούμενης υπό δοκιμή ουσίας. Στην περίπτωση αυτή, με βάση ιστορικά δεδομένα, θα πρέπει να οριστούν κατάλληλα οι περιοχές των τιμών EC_{50} και ο PIF ή η MRE (mean photo elfeet) ως κριτήρια αποδοχής για τη δοκιμή.

1.7 Περιγραφή της μεθόδου δοκιμής

1.7.1 Παρασκευάσματα

1.7.1.1 Κύτταρα

Στη μελέτη επικύρωσης χρησιμοποιήθηκε μόνιμη κυτταρική σειρά ινοβλαστών ποντικού —Balb/c 3T3, κλώνος 31— είτε από την ATCC είτε από την ECACC, η οποία επομένως και προτείνεται. Στο ίδιο πρωτόκολλο δοκιμής μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου επιτυχώς και άλλα κύτταρα ή κυτταρικές σειρές, εφόσον οι συνθήκες καλλιέργειας είναι προσαρμοσμένες στις ειδικές ανάγκες των κυττάρων, πρέπει όμως να καταδεικνύεται η ισοδυναμία.

Τα κύτταρα θα πρέπει κανονικά να ελέγχονται μήπως είναι μολυσμένα από μικρόπλασμα και να χρησιμοποιούνται μόνον εφόσον τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού είναι ικανοποιητικά.

Επειδή η ευαισθησία των κυττάρων σε UVA μπορεί να αυξάνεται με τον αριθμό των διελεύσεων, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κύτταρα Balb/c 3T3 με τον χαμηλότερο δυνατόν αριθμό διελεύσεων, κατά προτίμηση κάτω των 100. Έχει ιδιαίτερη σημασία, η ευαισθησία σε UVA των κυττάρων Balb/c 3T3 να ελέγχεται τακτικά σύμφωνα με τη διαδικασία ποιοτικού ελέγχου που περιγράφεται στις παρούσες κατευθυντήριες γραμμές.

1.7.1.2 Μέσα και συνθήκες καλλιέργειας

Για τη συνθήκη διέλευση κυττάρων και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας δοκιμής θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλα μέσα καλλιέργειας και συνθήκες επώασης. Για κύτταρα Balb/c 3T3 τα μέσα αυτά είναι DMEM με προσθήκη 10% ορού νεογέννητου μοσχαριού, 4 mM γλουταμίνη, πениκιλλίνη και στρεπτομυκίνη, και επώαση με υγρασία στους $37^\circ\text{C}/7,5\%$ CO_2 . Είναι ιδιαίτερα σημαντικό, οι συνθήκες της κυτταρικής καλλιέργειας να διασφαλίζουν χρόνο κυτταρικού κύκλου στα κανονικά ιστορικά πλαίσια των χρησιμοποιούμενων κυττάρων ή κυτταρικών σειρών.

1.7.1.3 Ετοιμασία των καλλιεργιών

Κύτταρα από κατεψυγμένες αρχικές καλλιέργειες εμβολιάζονται σε μέσον καλλιέργειας στην κατάλληλη πυκνότητα και χωρίζονται σε υποκαλλιέργειες τουλάχιστον μια φορά πριν να χρησιμοποιηθούν στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας.

Για τη δοκιμή φωτοτοξικότητας, τα κύτταρα εμβολιάζονται σε μέσον καλλιέργειας σε πυκνότητα τέτοια ώστε οι καλλιέργειες να μη φθάνουν σε κατάσταση συρροής μέχρι το τέλος της δοκιμής, δηλαδή όταν η κυτταρική βιωσιμότητα προσδιορίζεται 48 ώρες μετά τη διασπορά των κυττάρων. Στην περίπτωση κυττάρων Balb/c 3T3 καλλιεργούμενων σε τρυβλία 96 κοιλότητων, η συνιστώμενη κυτταρική πυκνότητα είναι 1×10^4 κύτταρα ανά κοιλότητα.

Για κάθε δοκιμαζόμενη χημική ουσία, τα κύτταρα εμβολιάζονται με τον ίδιο τρόπο σε δύο χωριστά τρυβλία των 96 κοιλότητων, τα οποία περνούν στη συνέχεια ταυτόχρονα από όλη τη διαδικασία δοκιμής υπό ταυτόσημες συνθήκες καλλιέργειας, εκτός από τη χρονική περίοδο όπου ένα από τα τρυβλία ακτινοβολείται (+UVA/ορατό) και το άλλο διατηρείται στο σκοτάδι (-UVA/ορατό).

1.7.1.4 Μεταβολική ενεργοποίηση

Αν και η χρήση μεταβολικών συστημάτων αποτελεί γενική απαίτηση για όλες τις *in vitro* δοκιμές για την πρόβλεψη γονιδιοτοξικών και καρκινογόνων δυνατοτήτων, μέχρι σήμερα, στην περίπτωση της φωτοτοξικολογίας, δεν υπάρχει καμία γνωστή χημική ουσία για την οποία να χρειάζεται μεταβολικός μετασηματισμός προκειμένου η ουσία να δράσει ως φωτοτοξίνη *in vivo* ή *in vitro*. Έτσι, ούτε θεωρείται αναγκαίο ούτε δικαιολογείται επιστημονικά η εκτέλεση της παρούσας δοκιμής με κάποιο σύστημα μεταβολικής ενεργοποίησης.

1.7.1.5 Υπό δοκιμή ουσία/παρασκευή

Οι υπό δοκιμή ουσίες πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένες λίγο πριν από τη χρήση τους, εκτός κι αν τα υφιστάμενα στοιχεία σταθερότητας επιτρέπουν την αποθήκευση. Στην περίπτωση που υπάρχει πιθανότητα ταχείας φωτοαποικοδόμησης, μπορεί να απαιτείται παρασκευή με ερυθρό φως.

Οι υπό δοκιμή ουσίες θα πρέπει να διαλύονται σε ρυθμιστικά αλατούχα διαλύματα, π.χ. Earl's balanced salt solution, (EBSS) ή phosphate buffered saline (PBS), τα οποία, για λόγους αποφυγής παρεμβατικών φαινομένων κατά τη διάρκεια της ακτινοβολήσης, πρέπει να είναι απηλλαγμένα πρωτεϊνικών συστατικών και χρωστικών δεικτών pH που απορροφούν το φως.

Ουσίες με περιορισμένη υδατοδιαλυτότητα θα πρέπει να διαλύονται σε κατάλληλους διαλύτες στο εκατονταπλάσιο της επιθυμητής τελικής συγκέντρωσης και κατόπιν να αραιώνονται 1:100 με το ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα. Εφόσον χρησιμοποιείται διαλύτης, αυτός πρέπει να υπάρχει σε σταθερό όγκο 1% (v/v) σε όλες τις καλλιέργειες, δηλαδή τόσο στους αρνητικούς μάρτυρες όσο και σε όλες τις συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας.

Ως διαλύτες συνιστώνται το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και η αιθανόλη (EtOH). Κατάλληλοι μπορεί να είναι και άλλοι διαλύτες με χαμηλή κυτταροτοξικότητα (π.χ. ακετόνη), πρέπει όμως να ελέγχονται προσεκτικά μήπως τυχόν εμφανίζουν κάποιες ειδικές ιδιότητες, π.χ. αντιδρούν με την υπό δοκιμή ουσία, παγώνουν την φωτοτοξική επίδραση, ενώνονται με ρίζες, κ.λπ.

Προς υποβοήθηση της υποβοήθησης της διαλυτοποίησης να χρησιμοποιηθεί, εφόσον απαιτείται, ανάμειξη με vortex ή/και επίδραση υπερήχων ή/και θέρμανση στους 37°C.

1.7.1.6 Αντινοβολία UV προετοιμασία

Φωτεινή πηγή: ο κρισιμότερος παράγοντας στη δοκιμή φωτοτοξικότητας είναι η επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής και κατάλληλου φίλτρου. Η ζώνη UVA και οι ορατές περιοχές σχετίζονται συνήθως με φαινόμενα φωτοευαισθητοποίησης (7) (10), ενώ η UVB σχετίζεται λιγότερο και είναι απευθείας λίαν κυτταροτοξική, η δε κυτταροτοξικότητα της αυξάνεται μέχρι το χιλιαπλάσιο στην περιοχή από 313 έως 280 nm (11). Στα κριτήρια για την επιλογή κατάλληλης φωτεινής πηγής θα πρέπει να περιλαμβάνεται ως βασική απαίτηση, τα κύματα που εκπέμπονται από τη φωτεινή πηγή να έχουν μήκος κύματος απορροφούμενο από την υπό δοκιμή ουσία ενώ η φωτεινή δόση (που πρέπει να επιτυγχάνεται μέσα σε λογικό χρονικό διάστημα) θα πρέπει να είναι επαρκής για την ανίχνευση γνωστών φωτοευαισθητοποιητικών ουσιών. Περαιτέρω, τα χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος και οι δόσεις δεν θα πρέπει να έχουν ανεπίτρεπτες επιδράσεις στο σύστημα δοκιμής, συμπεριλαμβανομένης και της εκπομπής θερμότητας (περιοχή υπερύθρου).

Ως άριστη φωτεινή πηγή θεωρείται η προσομοίωση του ηλιακού φωτός με ηλιακούς προσομοιωτές. Στους ηλιακούς προσομοιωτές χρησιμοποιούνται τόνον τόξα Xenon όσο και (επιχρισμένα) τόξα υδραργύρουμεταλλοαλογονιδίων. Τα τελευταία έχουν το πλεονέκτημα ότι εκπέμπουν λιγότερη θερμότητα και είναι φθηνότερα, δεν ταιριάζουν όμως απόλυτα με το ηλιακό φως. Επειδή όλοι οι ηλιακοί προσομοιωτές εκπέμπουν σημαντικές ποσότητες UVB, θα πρέπει να φιλτράρονται κατάλληλα ώστε να εξασθενεί η υψηλής κυτταροτοξικότητας ακτινοβολία UVB.

Για την in vitro 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας θα πρέπει να χρησιμοποιείται φάσμα ακτινοβολίας απηλλαγμένο πρακτικά από UVB (UVA:UVB ~ 1:20). Έχει δημοσιευτεί παράδειγμα της κατανομής της φασματικής ακτινοβολίας του φιλτραρισμένου ηλιακού προσομοιωτή που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη επίσης της in vitro 3T3 NRU δοκιμής φωτοτοξικότητας (3).

Δοσομετρία: Η ένταση του φωτός (ένταση ακτινοβολίας) θα πρέπει να ελέγχεται κανονικά πριν από κάθε δοκιμή φωτοτοξικότητας, χρησιμοποιώντας κατάλληλο ευρύζωνο υπερδιόδομετρο. Το UV-μέτρο πρέπει να διακρίβνεται ως προς την πηγή. Η λειτουργία του UV-μέτρου θα πρέπει να ελέγχεται, και για το σκοπό αυτό, συνιστάται η χρήση ενός δευτέρου UV-μέτρου αναφοράς του ίδιου τύπου και με ταυτόσημη διακρίβωση. Θεωρητικά, κατά μεγάλα διαστήματα, θα πρέπει να χρησιμοποιείται φασματοακτινόμετρο για να μετρείται η φασματική ακτινοβολία της φιλτραρισμένης φωτεινής πηγής και να ελέγχεται η βαθμονόμηση του ευρύζωνου UV-μέτρου, τα όργανα αυτά όμως απαιτούν χειρισμό μόνον από κατάλληλα εκπαιδευμένα άτομα.

Στη μελέτη επικύρωσης προσδιορίστηκε ότι δόση 5 J/cm² (UVA) δεν παρουσιάζει κυτταροτοξικότητα για τα κύτταρα Balb/c 3T3, είναι όμως επαρκής για τη διέγερση έστω και ασθενών φωτοτοξικών χημικών ουσιών. Για την επίτευξη 5 J/cm² εντός χρονικού διαστήματος 50 min, η ένταση της ακτινοβολίας πρέπει να προσαρμόζεται στα 1,666 mW/cm². Εφόσον χρησιμοποιηθεί άλλη κυτταρική σειρά ή διαφορετική φωτεινή πηγή, η δόση UVA μπορεί να πρέπει να προσαρμοστεί ελαφρώς, με βάση τα κριτήρια της μη δυσμενούς επίδρασης στα κύτταρα και της επάρκειας για την ανίχνευση συνήθων φωτοτοξινών. Ο χρόνος της φωτεινής έκθεσης υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{δόση ακτινοβολίας (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{ένταση ακτινοβολίας (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2 Συνθήκες δοκιμής

Η μέγιστη συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή ουσίας δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 100 µg/ml, αφού όλες οι φωτοτοξικές ουσίες ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξάνει η πιθανότητα εμφάνισης εσφαλμένων θετικών αποτελεσμάτων (υπερβολικών προβλέψεων) (13). Το pH της υψηλότερης συγκέντρωσης της υπό δοκιμή ουσίας θα πρέπει να είναι ικανοποιητικό (περιοχή pH: 6,5-7,8).

Οι περιοχές συγκεντρώσεων μιας χημικής ουσίας που υποβάλλεται σε δοκιμή παρουσία (+UVA) και απουσία (-UVA) φωτός θα πρέπει να προσδιορίζονται κατάλληλα με προηγούμενα πειράματα για εύρεση της περιοχής. Το εύρος και το διάστημα μιας σειράς συγκεντρώσεων πρέπει να προσαρμόζονται έτσι ώστε οι καμπύλες συγκεντρώσης-απόκρισης να υποστηρίζονται από επαρκή πειραματικά δεδομένα. Θα πρέπει να χρησιμοποιείται γεωμετρική σειρά συγκεντρώσεων (με σταθερό συντελεστή αραιώσης).

1.7.3 Διαδικασία δοκιμή⁽¹⁾

1.7.3.1 Πρώτη ημέρα

Παρασκευάζεται εναιώρημα κυττάρων με 1×10^5 κύτταρα/μλ σε μέσον καλλιέργειας και προστίθενται 100 μλ μέσου καλλιέργειας στις περιφερειακές μόνον κοιλότητες ενός μικροπιλοδοτικού τρυβλίου με 96 κοιλότητες (= λευκά). Στις εναπομένουσες κοιλότητες, προστίθενται 100 μλ κυτταρικού εναιωρήματος με 1×10^5 κύτταρα/μλ (= 1×10^4 κύτταρα/κοιλότητα). Για κάθε δοκιμαζόμενη ουσία, ετοιμάζονται δύο τρυβλία: ένα για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικότητας (-UVA), και το άλλο για τον προσδιορισμό της φωτοκυτταροτοξικότητας (+UVA).

Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h (7,5 % CO₂, 37°C) έως ότου σχηματίζουν μονοστιβάδα σε επίπεδα ημισυρροής. Η περίοδος αυτή επώασης επιτρέπει την επαναφορά σε κανονική κατάσταση και πρόσφυση των κυττάρων και την εκθετική τους αύξηση.

1.7.3.2 Δεύτερη ημέρα

Μετά την επώαση, το μέσον καλλιέργειας απομακρύνεται από τα κύτταρα και ακολουθεί διπλή έκπλυση με 150 μλ EBSS/PBS ανά κοιλότητα. Προστίθενται 100 μλ EBSS/PBS με την κατάλληλη συγκέντρωση ουσίας ή απλώς διαλύτη (αρνητικός μάρτυρας). Χρησιμοποιούνται 8 διαφορετικές συγκεντρώσεις της υπό δοκιμή ουσίας. Τα κύτταρα επωάζονται με την υπό δοκιμή ουσία στο σκοτάδι για 60 λεπτά (7,5 % CO₂, 37°C).

Για την εκτέλεση του (+UVA) τμήματος της δοκιμής, τα κύτταρα ακτινοβολούνται μέσα από το καπάκι του τρυβλίου με 96 κοιλότητες με 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Για την αποφυγή συμπίκνωσης υδρατμών κάτω από το καπάκι χρησιμοποιείται ένας ανεμιστήρας. Διπλά τρυβλία (-UVA) διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε ένα σκοτεινό κουτί για 50 min (= χρόνος έκθεσης UVA).

Το υπό δοκιμή διάλυμα μεταγγίζεται και ακολουθεί έκπλυση δύο φορές με 150 μλ EBSS/PBS. Το EBSS/PBS αντικαθίσταται με μέσον καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση (7,5 % CO₂, 37°C) όλη τη νύκτα (18-22 h).

1.7.3.3 Τρίτη ημέρα

Μικροσκοπική αξιολόγηση

Τα κύτταρα εξετάζονται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων. Καταγράφονται οι μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων που οφείλονται στην κυτταροτοξική επίδραση της υπό δοκιμή ουσίας. Ο έλεγχος αυτός συνίσταται για την αποφυγή πειραματικών λαθών, τα στοιχεία όμως αυτά δεν χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της κυτταροτοξικότητας ή της φωτοτοξικότητας.

Δοκιμή neutral red uptake

Τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 μλ προθερμασμένο EBSS/PBS. Το διάλυμα εκπλύσεως απομακρύνεται με ήπια άντληση. Προστίθενται 100 μλ μέσου NR και ακολουθεί επώαση στους 37°C, σε ένυγη ατμόσφαιρα με 7,5 % CO₂ για 3 h.

Μετά την επώαση, το μέσον NR απομακρύνεται και τα κύτταρα εκπλύνονται με 150 μλ EBSS/PBS. Ακολουθεί ολοκληρωτική μετάγγιση και στύπωση του EBSS/PBS. (Προαιρετικώς: ανάστροφη φυγοκέντρηση)

Προστίθενται ακριβώς 150 μλ διάλυμα εκρόφησης NR (προσφάτως παρασκευασθέν διάλυμα αιθανόλης/οξικού οξέος)

Το μικροπιλοδοτικό τρυβλίο ανακινείται με ταχύτητα με τη βοήθεια αναταράκτη (σέικερ) μικροπιλοδοτικών τρυβλίων επί 10 min, μέχρις ότου εκχυλιστεί το NR από τα κύτταρα και σχηματιστεί ομοιογενές διάλυμα.

Μετρείται η οπτική πυκνότητα του εκχυλίσματος NR στα 540 nm με φασματοφωτόμετρο, χρησιμοποιώντας τα λευκά ως σημεία αναφοράς. Τα δεδομένα σώζονται σε κατάλληλη μορφή (π.χ. ASCII) για μεταγενέστερη ανάλυση.

⁽¹⁾ Πρόσθετες λεπτομέρειες μπορούν να βρεθούν στην παραπομπή 12.

2 ΔΕΔΟΜΕΝΑ

2.1 Ποιότητα και ποσότητα δεδομένων

Τα δεδομένα θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να μπορεί να γίνει ουσιαστική ανάλυση της σχέσης συγκέντρωσης-απόκρισης παρουσία και απουσία UVA/ορατής ακτινοβολίας. Εφόσον διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα, τόσο το εύρος των συγκεντρώσεων όσο και το μεταξύ των επιμέρους συγκεντρώσεων διάστημα θα πρέπει να ρυθμίζονται έτσι ώστε να μπορεί να χαραχθεί καμπύλη σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα. Λόγω του ότι μια υπό δοκιμή ουσία μπορεί να μην είναι κυτταροτοξική μέχρι την καθορισμένη οριακή συγκέντρωση των 100 µg/ml στο σκοτεινό πείραμα (-UVA), αλλά λιαν τοξική όταν ακτινοβολείται (+UVA), τα προς έλεγχο εύρη των συγκεντρώσεων και στα δύο μέρη του πειράματος μπορεί να χρειάζεται να διαφέρουν κατά τάξεις μεγέθους ώστε να πληρούται η απαίτηση της κατάλληλης ποιότητας των δεδομένων. Εφόσον δεν διαπιστωθεί κυτταροτοξικότητα και στα δύο μέρη του πειράματος (-UVA και +UVA), αρκεί έλεγχος με μεγάλη απόσταση μεταξύ μεμονωμένων δόσεων μέχρι την υψηλότερη συγκέντρωση.

Δεν χρειάζεται οποιαδήποτε επαλήθευση με επαναληπτικό πείραμα στην περίπτωση σαφούς θετικού αποτελέσματος. Επιπλέον, δεν χρειάζεται να επαληθεύονται ούτε τα σαφή αρνητικά αποτελέσματα, υπό την προϋπόθεση ότι η υπό δοκιμή ουσία εξετάστηκε σε επαρκώς υψηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές, αρκεί ένα κύριο πείραμα, επικουρούμενο από ένα ή περισσότερα προκαταρκτικά πειράματα ανεύρεσης εύρους συγκεντρώσεων.

Δοκιμές με οριακά αποτελέσματα κοντά στη γραμμή τομής του μοντέλου πρόβλεψης θα πρέπει να επαναλαμβάνονται για επαλήθευση.

Εφόσον θεωρηθεί αναγκαία η επανάληψη της δοκιμής τότε, για τη λήψη σαφούς αποτελέσματος, μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο η διακύμανση των πειραματικών συνθηκών. Μια βασική μεταβλητή στη δοκιμή αυτή είναι η παρασκευή των διαλυμάτων της υπό δοκιμή ουσίας. Συνεπώς, η διακύμανση αυτών των συνθηκών (συνδιαλύτης, λειοτριβήση, εφαρμογή υπερήχων) μπορεί να έχει ουσιαστική σημασία στην επανάληψη της δοκιμής. Εναλλακτικώς, μπορεί να εξεταστεί και η διακύμανση του προ της ακτινοβολήσεως χρόνου επώασης. Η βράχυνση του χρόνου μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση υδατοαοσθιδίων χημικών ουσιών.

2.2 Επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Όπου είναι δυνατόν, προσδιορίζεται η συγκέντρωση μιας υπό δοκιμή ουσίας που παρουσιάζει 50 % αναστολή της κυτταρικής NRU (EC_{50}). Αυτό μπορεί να γίνει εφαρμόζοντας οποιαδήποτε κατάλληλη διαδικασία μη γραμμικής αναγωγής (κατά προτίμηση Hill ή λογιστική αναγωγή) στα δεδομένα συγκέντρωσης-απόκρισης, ή χρησιμοποιώντας άλλες διαδικασίες προσαρμογής (14). Πριν χρησιμοποιηθεί κάποια τιμή EC_{50} για περαιτέρω υπολογισμούς, θα πρέπει να ελέγχεται κατάλληλα η ποιότητα της προσαρμογής. Εναλλακτικώς, για τον υπολογισμό της EC_{50} μπορούν να χρησιμοποιηθούν γραφικές μέθοδοι προσαρμογής. Στην περίπτωση αυτή, συνιστάται η χρήση χάρτου πιθανοτήτων (*-κλίμακα: log, y-κλίμακα: probit), καθώς σε πολλές περιπτώσεις η συνάρτηση συγκέντρωσης-απόκρισης καθίσταται σχεδόν γραμμική μετά το μετασχηματισμό αυτό.

2.3 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (μοντέλα πρόβλεψης)

2.3.1 Μοντέλο πρόβλεψης έκδοσης 1: συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF)

Εάν τόσο παρουσία (+UVA) όσο και απουσία (-UVA) φωτός, λαμβάνονται πλήρεις καμπύλες συγκέντρωσης απόκρισης, ο συντελεστής φωτοερεθισμού (PIF) υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$(a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Τιμή PIF < 5, σημαίνει μη φωτοτοξική δυνατότητα, τιμή PIF ≥ 5 σημαίνει φωτοτοξική δυνατότητα.

Εάν μια χημική ουσία είναι κυτταροτοξική μόνο υπό συνθήκες +UVA και μη κυτταροτοξική όταν δοκιμάζεται υπό συνθήκες -UVA ο PIF δεν μπορεί να υπολογιστεί, αν και αυτό είναι ένα αποτέλεσμα που δείχνει φωτοτοξική δυνατότητα. Στις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να υπολογιστεί μια τιμή "PIF" εάν η δοκιμή κυτταροτοξικότητας (-) εκτελεστεί μέχρι την ανώτατη συγκέντρωση δοκιμής (C_{max}) οπότε αυτή η τιμή χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της "PIF":

$$(b) \quad > PIF = \frac{C_{max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Εάν μπορεί να ληφθεί μόνον τιμή "<PIF", τότε κάθε τιμή > 1 προλέγει φωτοτοξική δυνατότητα.

Εάν δεν μπορούν να υπολογιστούν ούτε η $EC_{50}(-UV)$ ούτε η $EC_{50}(+UV)$ λόγω του ότι η χημική ουσία δεν δείχνει καμία κυτταροτοξικότητα μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής, αυτό δείχνει την μη ύπαρξη φωτοτοξικής δυνατότητας. Στις περιπτώσεις αυτές, για τον χαρακτηρισμό του αποτελέσματος χρησιμοποιείται ένα τυπικό "PIF = * 1":

$$(c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{max}(-UV)}{C_{max}(+UV)}$$

Εάν μπορεί να ληφθεί μόνο η τιμή "PIF = * 1" αυτό σημαίνει τη μη ύπαρξη φωτοτοξικής δυνατότητας.

Στις περιπτώσεις (β) και (γ), θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη οι συγκεντρώσεις που λαμβάνονται στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας προκειμένου να προβλεφθεί η φωτοτοξική δυνατότητα

2.3.2 Μοντέλο πρόβλεψης έκδοσης 2: μέση φωτοεπίδραση (MPE)

Εναλλακτικά, μπορεί να εφαρμοστεί και μια νέα έκδοση του μοντέλου για την πρόβλεψη της φωτοτοξικής δυνατότητας, που έχει αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας δεδομένα της μελέτης επικύρωσης των ΕΕ/COLIPA (15) και δοκιμάσκει υπό τυφλές συνθήκες σε μεταγενέστερη μελέτη για την *in vitro* φωτοτοξικότητα χημικών φίλτρων UV (13). Το μοντέλο αυτό υπερπηδά τον περιορισμό του μοντέλου PIF στις περιπτώσεις που δεν μπορεί να ληφθεί τιμή EC₅₀. Το μοντέλο χρησιμοποιεί τη "μέση φωτοεπίδραση" (MPE), μέτρο το οποίο βασίζεται σε σύγκριση των πλήρων καμπυλών συγκέντρωσης απόκρισης. Για την εφαρμογή του μοντέλου MPE, αναπτύχθηκε στο Humboldt University (Berlin, D) ένα ειδικό λογισμικό που μπορεί να παραληφθεί δωρεάν.

2.4 Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Θετικό αποτέλεσμα στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας (PIF ≥ 5 ή MPE $\geq 0,1$) σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία έχει φωτοτοξική δυνατότητα. Εάν το αποτέλεσμα αυτό λαμβάνεται σε συγκεντρώσεις κάτω των 10 µg/ml, η υπό δοκιμή ουσία είναι επίσης πιθανόν να δρα και ως φωτοτοξίνη και υπό ποικίλες συνθήκες έκθεσης *in vivo*. Εάν ληφθεί θετικό αποτέλεσμα μόνο στη μέγιστη συγκέντρωση δοκιμής των 100 µg/ml, για την εκτίμηση των κινδύνων ή της φωτοτοξικής ισχύος μπορεί να απαιτείται να ληφθούν υπόψη και άλλα στοιχεία. Σε αυτά μπορεί να περιλαμβάνονται στοιχεία για τη διείσδυση, την απορρόφηση και πιθανή συσσώρευση της ουσίας στο δέρμα, ή έλεγχος της ουσίας σε επιβεβαιωτική εναλλακτική δοκιμή, π.χ. χρησιμοποιώντας μοντέλο ανθρώπινου δέρματος *in vitro*.

Αρνητικό αποτέλεσμα από την *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας (PIF < 5 ή MPE < 0,1) σημαίνει ότι η υπό δοκιμή ουσία δεν είναι φωτοτοξική στα καλλιεργημένα κύτταρα θηλαστικών υπό τις χρησιμοποιούμενες συνθήκες. Στις περιπτώσεις όπου η ουσία μπόρεσε να δοκιμασθεί μέχρι τη μέγιστη συγκέντρωση των 100 µg/ml, τυχόν αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι η ουσία δεν έχει φωτοτοξική δυνατότητα, η δε φωτοτοξικότητα *in vivo* μπορεί να θεωρηθεί ως απίθανη. Στις περιπτώσεις όπου ελήφθησαν ταυτόσημες αποκρίσεις συγκέντρωσης-τοξικότητας (EC₅₀ + UV και EC₅₀ - UV) σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μπορεί να είναι η ίδια. Αντιθέτως, αν δεν καταδείχθηκε τοξικότητα (+UV και -UV) αλλά λόγω μειωμένης υδατοδιαλυτότητας της ουσίας οι συγκεντρώσεις περιορίστηκαν σε τιμές χαμηλότερες των 100 µg/ml, τότε μπορεί να τεθεί εν αμφιβολία η συμβατότητα της υπό δοκιμή ουσίας με τη δοκιμή και θα πρέπει να εξεταστεί το ενδεχόμενο διεξαγωγής επιβεβαιωτικής δοκιμασίας (π.χ. χρησιμοποιώντας μοντέλο δέρματος *in vitro*, ή μοντέλο δέρματος *ex vivo* δοκιμή *in vivo*).

3 ΑΝΑΦΟΡΑ

Έκθεση δοκιμής

Η έκθεση δοκιμής πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία:

Υπό δοκιμή ουσία:

- στοιχεία ταυτοποίησης και αριθμός CAS, εάν είναι γνωστά,
- φυσική μορφή και καθαρότητα,
- φυσικοχημικές ιδιότητες σχετικές με τη διεξαγωγή της μελέτης,
- σταθερότητα και φωτοσταθερότητα, εάν είναι γνωστές.

Διαλύτης:

- αιτιοκόνηση της επιλογής του διαλύτη,
- διαλυτότητα της υπό δοκιμή ουσίας στον διαλύτη,
- ποσοστό διαλύτη ευρισκόμενο στο μέσο κατεργασίας (EBSS ή PBS).

Κύτταρα:

- τύπος και πηγή κυττάρων
- απουσία μυκοπλάσματος,
- αριθμός κυτταρικών διελεύσεων, αν είναι γνωστές,
- ευαισθησία των κυττάρων σε UVA, προσδιοριζόμενη με τον εξοπλισμό ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται στην *in vitro* 3T3 NRU δοκιμή φωτοτοξικότητας.

Συνθήκες δοκιμής (α)/επίθεση πριν και μετά την κατεργασία:

- τύπος και σύσταση του μέσου καλλιέργειας,
- συνθήκες επίθεσης (συγκέντρωση CO₂, θερμοκρασία, υγρασία),
- διάρκεια της επίθεσης (προκατεργασία, μετακατεργασία).

Συνθήκες δοκιμής (β)/κατεργασία με την χημική ουσία:

- σκεπτικό της επιλογής των συγκεντρώσεων της υπό δοκιμή ουσίας που χρησιμοποιούνται με και χωρίς ακτινοβόληση UV/ορατού,
- σε περίπτωση περιορισμένης διαλυτότητας της υπό δοκιμή ουσίας και απουσίας κυτταροτοξικότητας, σκεπτικό της χρησιμοποιηθείσας υψηλότερης συγκέντρωσης,
- τύπος και σύσταση του μέσου κατεργασίας (ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα),
- διάρκεια της χημικής κατεργασίας.

Συνθήκες δοκιμής (γ)/ακτινοβόληση:

- σκεπτικό επιλογής της χρησιμοποιούμενης φωτεινής πηγής,
- χαρακτηριστικά φασματικής αντινοβολίας της φωτεινής πηγής,
- χαρακτηριστικά διαφάνειας/απορρόφησης του ή των χρησιμοποιούμενων φίλτρων,
- χαρακτηριστικά του ακτινομέτρου και λεπτομέρειες διακρίβωσής του,
- απόσταση της φωτεινής πηγής από το σύστημα δοκιμής,
- ένταση ακτινοβολίας UVA στην απόσταση αυτή, εκφραζόμενη σε mW/cm^2 ,
- διάρκεια έκθεσης σε UV/ορατό φως,
- δόση UVA (ένταση ακτινοβολίας × χρόνος), εκφραζόμενη σε J/cm^2 ,
- θερμοκρασία χρησιμοποιούμενη στις κυτταρικές καλλιέργειες κατά τη διάρκεια της ακτινοβόλησης και στις ταυτόχρονα διατηρούμενες στο σκοτάδι κυτταρικές καλλιέργειες.

Συνθήκες δοκιμής (δ)/δοκιμή NRU:

- σύσταση του μέσου NR,
- διάρκεια επώασης NR,
- συνθήκες επώασης (συγκέντρωση CO_2 , θερμοκρασία, υγρασία),
- συνθήκες εκχύλισης NR (εχχυλιστικό, διάρκεια),
- μήκος κύματος χρησιμοποιούμενο για την φασματοφωτομετρική ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας NR,
- δεύτερο μήκος κύματος (αναφοράς), εφόσον χρησιμοποιείται,
- περιεχόμενο λευκού του φασματοφωτομέτρου, εφόσον χρησιμοποιείται.

Αποτελέσματα:

- κυτταρική βιωσιμότητα λαμβανόμενη σε κάθε συγκέντρωση της υπό δοκιμή ουσίας, εκφραζόμενη σε ποσοστιαία μέση βιωσιμότητα των μαρτύρων,
- καμπύλες συγκέντρωσης — απόκρισης (συγκέντρωση υπό δοκιμή ουσίας σε συνάρτηση με τη σχετική κυτταρική βιωσιμότητα), λαμβανόμενες σε ταυτόχρονα πειράματα +UVA και -UVA,
- ανάλυση δεδομένων καμπυλών συγκέντρωσης — απόκρισης: εφόσον είναι δυνατόν, εκτίμηση/υπολογισμός των EC_{50} (+UVA) και EC_{50} (-UVA),
- σύγκριση των δύο καμπυλών συγκέντρωσης - απόκρισης που λαμβάνονται με και χωρίς ακτινοβόληση UVA/ορατού είτε με υπολογισμό του συντελεστή φωτοερεθισμού (PIF) είτε με υπολογισμό της μέσης φωτοεπίδρασης (MPE),
- ταξινόμηση της φωτοτοξικής δυνατότητας,
- κριτήρια αποδοχής δοκιμής (α)/ταυτόχρονος αρνητικός μάρτυρας:
 - απόλυτη βιωσιμότητα (οπτική πυκνότητα εκχυλίσματος NR) ακτινοβολημένων και μη κυττάρων,
 - ιστορικά στοιχεία αρνητικού μάρτυρα, μέση τιμή και τυπική απόκλιση,
- κριτήρια αποδοχής δοκιμής (β)/ταυτόχρονος θετικός μάρτυρας:
 - EC_{50} (+UVA) και EC_{50} (-UVA) και PIF θετικού μάρτυρα,
 - ιστορικά στοιχεία θετικού μάρτυρα: EC_{50} (+UVA) και EC_{50} (-UVA) και PIF, μέση τιμή και τυπική απόκλιση

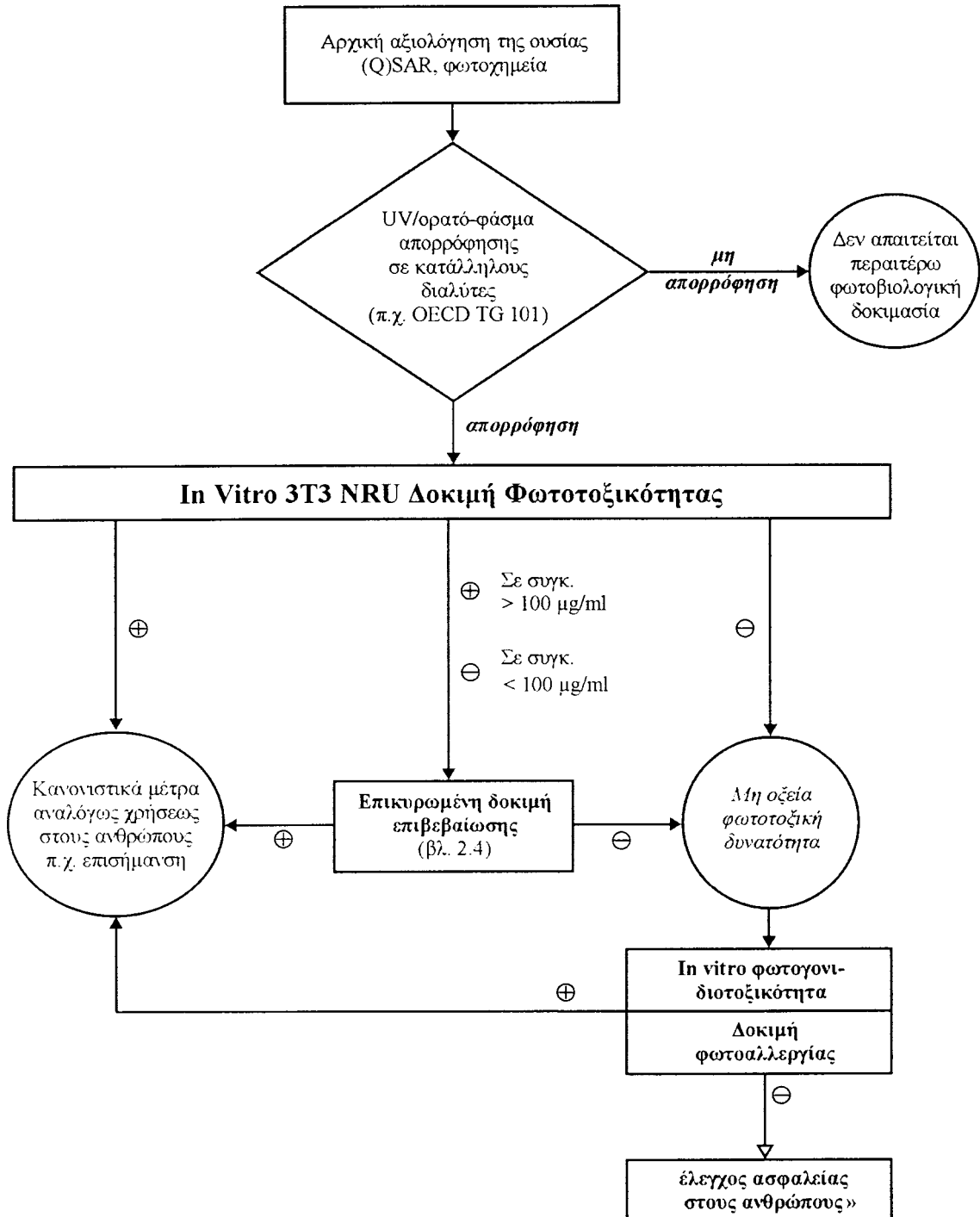
*Συζήτηση των αποτελεσμάτων**Συμπεράσματα*

ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994), EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro* 8, σσ. 793-796.
- (2) Anon (1998), Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA* 26, σσ. 7-8.
- (3) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clotier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998), EU/COLIPA 'In vitro phototoxicity' validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, σσ. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, σσ. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, *Research progress in organic, biological and medicinal chemistry* Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, σσ. XI-XXXΩ.
- (7) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994), *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2, *ATLA* 22, σσ. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, *The science of photobiology*, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, σσ. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, σσ. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, *Dermatotoxicology*, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, σσ. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and Pidoux M (1987), Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes, *Cancer Research* 47, σσ. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project 'In Vitro Photoirritation'.
- (13) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998), A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, *ATLA* 26, σσ. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, σσ. 127-138.
- (15) Holzhütter, H.G. (1997), A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals, *ATLA* 25, σσ. 445-462.

Προσάρτημα

Ρόλος της 3T3 NRU ΔΦ σε μια διαδοχική προσέγγιση του ελέγχου της φωτοτοξικότητας των χημικών ουσιών



II

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση)

ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 19ης Μαΐου 2000

για διόρθωση της οδηγίας 98/98/ΕΚ σχετικά με την προσαρμογή, για εικοστή πέμπτη φορά, στην τεχνική πρόοδο της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό E(2000) 1333]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2000/368/ΕΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 67/548/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 27ης Ιουνίου 1967, περί προσεγγίσεως των νομοθετικών, κανονιστικών και διοικητικών διατάξεων, που αφορούν την ταξινόμηση, συσκευασία και επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών⁽¹⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 1999/33/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου⁽²⁾, και ιδίως το άρθρο 28,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Το παράρτημα VI της οδηγίας 67/548/ΕΟΚ⁽³⁾ περιλαμβάνει οδηγό για την ταξινόμηση και την επισήμανση των επικίνδυνων ουσιών και παρασκευασμάτων· το παράρτημα VI τροποποιήθηκε για τελευταία φορά από το παράρτημα 4 της οδηγίας 98/98/ΕΚ. Τα τμήματα 3.2.3, 3.2.8, 6.2 και 8 του παραρτήματος 4 της οδηγίας 98/98/ΕΚ δεν είναι πλήρη και κατά συνέπεια κρίνεται απαραίτητο να διορθωθεί το παράρτημα 4 της οδηγίας 98/98/ΕΚ.
- (2) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της επιτροπής για την προσαρμογή

στην τεχνική πρόοδο των οδηγιών που αποσκοπούν στην εξάλειψη των τεχνικών φραγμών του εμπορίου σε ό,τι αφορά τις επικίνδυνες ουσίες και τα παρασκευάσματα,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Το παράρτημα 4 της οδηγίας 98/98/ΕΚ αντικαθίσταται από το παράρτημα της παρούσας απόφασης.

Άρθρο 2

Η παρούσα οδηγία απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 19 Μαΐου 2000.

Για την Επιτροπή
Margot WALLSTRÖM
Μέλος της Επιτροπής

⁽¹⁾ ΕΕ 196 της 16.8.1967, σ. 1.

⁽²⁾ ΕΕ L 199 της 30.7.1999, σ. 57.

⁽³⁾ ΕΕ L 355 της 30.12.1998, σ. 1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

«ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

- 1.6. Τα στοιχεία που απαιτούνται για την ταξινόμηση και την επισήμανση των ουσιών μπορούν να ληφθούν ως εξής:
- όσον αφορά ουσίες για τις οποίες απαιτούνται οι πληροφορίες που καθορίζονται στο παράρτημα VII, τα περισσότερα από τα στοιχεία που είναι αναγκαία για την ταξινόμηση και επισήμανση περιλαμβάνονται στο "βασικό φάκελο". Η ταξινόμηση και επισήμανση πρέπει να επανεξετάζονται, εάν είναι αναγκαίο, όταν υπάρχουν διαθέσιμες κι άλλες πληροφορίες (παράρτημα VIII).
 - όσον αφορά άλλες ουσίες (π.χ. εκείνες που αναφέρονται στο σημείο 1.5 παραπάνω), τα στοιχεία που απαιτούνται για την ταξινόμηση και επισήμανση μπορούν, εάν είναι αναγκαίο, να ληφθούν από διάφορες πηγές, π.χ. από τα αποτελέσματα προηγούμενων δοκιμών, πληροφορίες που απαιτούνται από τους διεθνείς κανονισμούς μεταφοράς επικινδυνών ουσιών, πληροφορίες που προέρχονται από εργασίες αναφοράς και τη βιβλιογραφία ή πληροφορίες που είναι αποτέλεσμα πρακτικών εμπειριών. Μπορούν επίσης να ληφθούν υπόψη, κατά περίπτωση, και τα αποτελέσματα έγκυρων μελετών σχέσεων δομής προς δραστικότητα και οι κρίσεις ειδικών.

Τα στοιχεία που απαιτούνται για την ταξινόμηση και επισήμανση παρασκευασμάτων μπορούν να ληφθούν:

- εφόσον πρόκειται για φυσικοχημικά δεδομένα, με την εφαρμογή των μεθόδων που καθορίζονται στο παράρτημα V. Για τον προσδιορισμό της ευφλεκτότητας και των οξειδωτικών ιδιοτήτων αερίων παρασκευασμάτων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μέθοδος υπολογισμού (βλέπε κεφάλαιο 9).
- εφόσον πρόκειται για δεδομένα σχετικά με τις επιπτώσεις στην υγεία:
 - με την εφαρμογή των μεθόδων που καθορίζονται στο παράρτημα V ή/και με την εφαρμογή της συμβατικής μεθόδου που αναφέρεται στο άρθρο 3 παραγράφος 5 στοιχεία α) έως θ) της οδηγίας 88/379/ΕΟΚ ή, στην περίπτωση της R 65, με την εφαρμογή των κανόνων του σημείου 3.2.3,
 - ωστόσο, εφόσον πρόκειται για την αξιολόγηση των καρκινογόνων, μεταλλαξιόνων και των επί της αναπαραγωγής επιπτώσεων, με την εφαρμογή της συμβατικής μεθόδου που αναφέρεται στο άρθρο 3 παραγράφος 5 στοιχεία ι) έως ιζ) της οδηγίας 88/379/ΕΟΚ.

Σημείωση αναφορικά με την εκτέλεση δοκιμών σε ζώα

Η εκτέλεση δοκιμών σε ζώα για τη συγκέντρωση πειραματικών δεδομένων υπόκειται στις διατάξεις της οδηγίας 86/609/ΕΟΚ περί της προστασίας των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς σκοπούς.

1.7.2. *Εφαρμογή των καθοδηγητικών κριτηρίων για ουσίες*

Τα καθοδηγητικά κριτήρια που καθορίζονται στο παρόν παράρτημα εφαρμόζονται ως έχουν όταν τα υπόψη δεδομένα έχουν αποκτηθεί με μεθόδους δοκιμών συγκρίσιμες με εκείνες που περιγράφονται στο παράρτημα V. Στις άλλες περιπτώσεις, τα διαθέσιμα δεδομένα πρέπει να αξιολογούνται με σύγκριση των εφαρμοσθεισών μεθόδων δοκιμών με εκείνες που αναφέρονται στο παράρτημα V και με τους κανόνες που καθορίζονται στο παρόν παράρτημα για τον προσδιορισμό της κατάλληλης ταξινόμησης και επισήμανσης.

Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρχουν αμφιβολίες ως προς την εφαρμογή των σχετικών κριτηρίων, ιδιαίτερα όταν απαιτείται γι' αυτά η κρίση ειδικών. Στις περιπτώσεις αυτές ο παραγωγός, ο διανομέας ή ο εισαγωγέας θα πρέπει να ταξινομήσουν προσωρινά και να επισημαίνουν την ουσία επί τη βάση αξιολόγησης των ενδείξεων από αρμόδιο άτομο.

Υπό την επιφύλαξη του άρθρου 6, όταν έχει εφαρμοστεί η ανωτέρω διαδικασία και εκφράζονται ανησυχίες για πιθανές ασυνέπειες, μπορεί να υποβληθεί πρόταση για την καταχώρηση της προσωρινής ταξινόμησης στο παράρτημα I. Η πρόταση θα πρέπει να υποβάλλεται σε ένα από τα κράτη μέλη και να συνοδεύεται από κατάλληλα επιστημονικά δεδομένα (βλέπε επίσης σημείο 4.1).

Παρόμοια διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί και όταν λαμβάνονται πληροφορίες που δημιουργούν υπόνοιες σχετικά με την ακρίβεια υφιστάμενης καταχώρησης, στο παράρτημα I.

2.2.2.1. *Παρατηρήσεις σχετικά με τα υπεροξειδία*

Για τις εκρηκτικές ιδιότητες, τα οργανικά υπεροξειδία ή τα παρασκευάσματά τους με τη μορφή που διατίθενται στην αγορά ταξινομούνται σύμφωνα με τα κριτήρια του σημείου 2.2.1 με βάση δοκιμές που διενεργούνται σύμφωνα με τις μεθόδους του παραρτήματος V.

Όσον αφορά τις οξειδωτικές ιδιότητες, στα οργανικά υπεροξειδία δεν μπορούν να εφαρμοστούν οι μέθοδοι του παραρτήματος V.

Όσον αφορά ουσίες, οργανικά υπεροξειδία που δεν έχουν ήδη ταξινομηθεί ως εκρηκτικά ταξινομούνται ως επικίνδυνα με βάση τη δομή τους (π.χ. R-O-O-H· R₁-O-O-R₂).

Παρασκευάσματα που δεν έχουν ήδη ταξινομηθεί ως εκρηκτικά ταξινομούνται με την εφαρμογή της υπολογιστικής μεθόδου που βασίζεται στο ποσοστό ενεργού οξυγόνου όπως περιγράφεται στο σημείο 9.5.

Τα οργανικά υπεροξειδία ή τα παρασκευάσματά τους που δεν έχουν ήδη ταξινομηθεί ως εκρηκτικά ταξινομούνται ως οξειδωτικά εάν τα υπεροξειδία ή τα παρασκευάσματά τους περιέχουν:

- οργανικά υπεροξειδία σε αναλογία μεγαλύτερη του 5 % ή,
- διαθέσιμο οξυγόνο από οργανικά υπεροξειδία σε αναλογία μεγαλύτερη του 0,5% και υπεροξειδίο του υδρογόνου σε αναλογία μεγαλύτερη του 5%.

3.2.3. Επιβλαβείς ουσίες

Οι ουσίες και τα παρασκευάσματα ταξινομούνται ως επιβλαβή και τους αποδίδεται το σύμβολο "Xn" και η ένδειξη κινδύνου "επιβλαβές" σύμφωνα με τα κριτήρια που ορίζονται κατωτέρω. Οι φράσεις κινδύνου προσδιορίζονται σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

R 22 Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης

Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας:

- LD₅₀ από του στόματος, σε επίμυες: 200 < LD₅₀ ≤ 2 000 mg/kg,
- διακριτική δόση, από του στόματος, σε επίμυες, 50 mg/kg: επιβίωση του 100 % αλλά με έκδηλη τοξικότητα,
- επιβίωση κάτω του 100 % σε δόση 500 mg/kg, σε επίμυες, από του στόματος με τη μέθοδο σταθερής δόσης. Βλέπε τον πίνακα εκτίμησης στη μέθοδο δοκιμής B1 (α) του παραρτήματος V.

R 21 Επιβλαβές σε επαφή με το δέρμα

Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας:

- LD₅₀ από του δέρματος, σε επίμυες ή κουνέλια: 400 < LD₅₀ ≤ 2 000 mg/kg.

R 20 Επιβλαβές όταν εισπνέεται

Αποτελέσματα οξείας τοξικότητας:

- LC₅₀ δι' εισπνοής, σε επίμυες, για αερολύματα ή σωματίδια: 1 < LC₅₀ ≤ 5 mg/l/4 ώρες,
- LC₅₀ δι' εισπνοής, σε επίμυες, για αέρια ή ατμούς: 2 < LC₅₀ ≤ 20 mg/l/4 ώρες.

R 65 Επιβλαβές: μπορεί να προκαλέσει βλάβη στους πνεύμονες σε περίπτωση κατάποσης

Υγρές ουσίες και παρασκευάσματα που εμφανίζουν κίνδυνο αναρρόφησης από τον άνθρωπο λόγω χαμηλού ιξώδους:

- a) για ουσίες και παρασκευάσματα που περιέχουν αλειφατικούς, αλεικυκλικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες σε συνολική συγκέντρωση ίση ή μεγαλύτερη από 10 % και έχουν είτε
 - χρόνο ροής μικρότερο από 30 sec. σε δοχείο ISO 3 mm σύμφωνα με το ISO 2431 , ή
 - κινηματικό ιξώδες μετρούμενο με διακριβωμένο υάλινο τριχοειδές ιξωδομέτρο σύμφωνα με το ISO 3104/3105 μικρότερο από 7×10^{-6} m²/sec. στους 40 °C, ή
 - κινηματικό ιξώδες βάσει μετρήσεων με τη μέθοδο της περιστροφικής ιξωδομετρίας σύμφωνα με το ISO 3129 μικρότερο από 7×10^{-6} μ²/sec. στους 40 °C.

Σημείωση: Να σημειωθεί ότι ουσίες και παρασκευάσματα που πληρούν τα κριτήρια αυτά δεν χρειάζεται να ταξινομηθούν εφόσον εμφανίζουν μέση επιφανειακή τάση μεγαλύτερη από 33 mN/m στους 25 °C μετρούμενη με το τασιόμετρο du Nuoy ή με τις μεθόδους δοκιμής του παραρτήματος V, μέρος A.5.

- β) για ουσίες και παρασκευάσματα, με βάση την πρακτική εμπειρία σε ανθρώπους.

R 40 Πιθανός κίνδυνος μόνιμων επιδράσεων

- επαρκείς αποδείξεις ότι μπορεί να προκληθούν μη αντιστρέψιμες βλάβες εκτός από τις επιπτώσεις που αναφέρονται στο κεφάλαιο 4, ύστερα από μια και μόνη έκθεση δια καταλλήλου οδού, γενικά στις δόσεις που αναφέρονται ανωτέρω.

Για την ένδειξη της οδού χορήγησης/έκθεσης χρησιμοποιείται ένας από τους ακόλουθους συνδυασμούς: R 40/20, R 40/21, R 40/22, R 40/20/21, R 40/20/22, R 40/21/22, R 40/20/21/22.

R 48 Κίνδυνος σοβαρής βλάβης της υγείας κατόπιν παρατεταμένης έκθεσης

- σοβαρή βλάβη (σαφής οργανική διαταραχή ή μορφολογική μεταβολή με τοξικολογική σημασία) μπορεί να προκληθεί λόγω επανειλημμένης ή παρατεταμένης έκθεσης δια καταλλήλου οδού.

Οι ουσίες και τα παρασκευάσματα ταξινομούνται τουλάχιστον ως επιβλαβή όταν οι επιπτώσεις αυτές παρατηρούνται σε επίπεδα της τάξης:

- από του στόματος, σε επίμυες ≤ 50 mg/kg (βάρους σώματος)/ημέρα,
- από του δέρματος, σε επίμυες ή κουνέλια ≤ 100 mg/kg (βάρους σώματος)/ημέρα,
- δι' εισπνοής, σε επίμυες $\leq 0,25$ mg/l, 6 h/ημέρα.

Αυτές οι κατευθυντήριες τιμές μπορούν να εφαρμοστούν άμεσα όταν παρατηρούνται σοβαρές βλάβες σε υποχρόνια (90 ημέρες) δοκιμασία τοξικότητας. Κατά την ερμηνεία αποτελεσμάτων δοκιμασίας υποξείας τοξικότητας (28 ημέρες) οι τιμές αυτές θα πρέπει να τριπλασιάζονται περίπου. Σε περίπτωση που διατίθενται αποτελέσματα δοκιμασιών χρόνιας τοξικότητας (διετής) αυτά πρέπει να αξιολογούνται κατά περίπτωση. Εάν διατίθενται αποτελέσματα δοκιμασιών διάφορης διάρκειας χρησιμοποιούνται κατά κανόνα εκείνα που αντιστοιχούν στη δοκιμασία με τη μεγαλύτερη διάρκεια.

Για την ένδειξη της οδού χορήγησης/έκθεσης χρησιμοποιείται ένας από τους ακόλουθους συνδυασμούς: R 48/20, R 48/21, R 48/22, R 48/20/21, R 48/20/22, R 48/21/22, R 48/20/21/22.

3.2.3.1. Σχόλια σχετικά με πτητικές ουσίες

Για ορισμένες ουσίες με υψηλή συγκέντρωση κορεσμένων ατμών είναι δυνατόν να διατίθενται ενδείξεις για επιπτώσεις που εμπνέουν ανησυχία. Οι ουσίες αυτές μπορεί να μη ταξινομούνται βάσει των κριτηρίων για τις επιπτώσεις στην υγεία του παρόντος οδηγού (3.2.3) ή να μην καλύπτονται από το 3.2.8. Εντούτοις, εάν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι οι ουσίες αυτές είναι δυνατόν να παρουσιάσουν κινδύνους κατά το συνήθη χειρισμό και χρήση τους, τότε μπορεί να απαιτηθεί να ταξινομηθούν κατά περίπτωση στο παράρτημα I.

3.2.6.1. Φλεγμονή του δέρματος

Πρέπει να χρησιμοποιείται, σύμφωνα με τα προβλεπόμενα κριτήρια, η ακόλουθη φράση:

R 38 Ερεθίζει το δέρμα

- Ουσίες και παρασκευάσματα που προκαλούν σοβαρή φλεγμονή του δέρματος η οποία εμμένει για 24 τουλάχιστον ώρες έπειτα από περίοδο έκθεσης μέχρι τεσσάρων ωρών προσδιοριζόμενη σε κουνέλια σύμφωνα με τη μέθοδο δοκιμής δερματικού ερεθισμού που αναφέρεται στο παράρτημα V.

Η φλεγμονή του δέρματος θεωρείται σοβαρή όταν:

- η μέση τιμή των αποτελεσμάτων, είτε πρόκειται για εμφάνιση ερυθήματος και εσχάρας είτε για εμφάνιση οιδήματος, υπολογιζόμενη σε όλα τα υπό δοκιμή ζώα, είναι 2 ή περισσότερο·
- ή, στην περίπτωση όπου η δοκιμή του παραρτήματος V έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση τριών ζώων, σε δύο ή περισσότερα ζώα παρατηρείται εμφάνιση είτε ερυθήματος και εσχάρας είτε οιδήματος ισοδύναμου με μια μέση τιμή 2 ή μεγαλύτερη, υπολογιζόμενη σε κάθε ζώο χωριστά.

Και στις δύο περιπτώσεις, για τον υπολογισμό των αντίστοιχων μέσων τιμών, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται όλες οι τιμές σε καθένα από τα χρονικά σημεία ελέγχου (24, 48 και 72 ώρες) πρόκλησης βλάβης.

Η φλεγμονή του δέρματος θεωρείται επίσης σοβαρή όταν εμμένει σε δύο τουλάχιστον ζώα μετά το τέλος του χρόνου παρατήρησης. Θα πρέπει επίσης να λαμβάνονται υπόψη και ειδικές επιπτώσεις όπως π.χ. υπερπλασία, απολέπιση, αποχρωματισμός, ραγάδες, εφελκίδες και αλωπεκίαση.

Σχετικά στοιχεία μπορούν επίσης να υπάρχουν και από μελέτες μη οξείας τοξικότητας σε ζώα (βλέπε σχόλια για την R 48, σημείο 2.δ). Τα στοιχεία αυτά θεωρούνται σημαντικά εάν τα εμφανιζόμενα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με εκείνα που περιγράφηκαν παραπάνω.

- Ουσίες και παρασκευάσματα που προκαλούν σοβαρή φλεγμονή του δέρματος με βάση παρατηρήσεις στην πράξη σε ανθρώπους σε άμεση, παρατεταμένη ή επαναλαμβανόμενη επαφή.
- Οργανικά υπεροξειδία, εκτός αν υπάρχουν ενδείξεις περί του αντιθέτου.

Παραισθησία: Παραισθησία που προκαλείται στον άνθρωπο λόγω επαφής με το δέρμα πυρεθροειδών γεωργικών φαρμάκων δεν θεωρείται ως ερεθιστική δράση που να δικαιολογεί ταξινόμηση ως Xi, R 38. Εντούτοις, για τις ουσίες που έχουν παρόμοια δράση, θα πρέπει να χρησιμοποιείται η φράση S 24.

3.2.8. Άλλες τοξικολογικές ιδιότητες

Σε ουσίες και παρασκευάσματα που ταξινομούνται βάσει του 2.2.1 έως 3.2.7 ανωτέρω ή/και των κεφαλαίων 4 και 5, πρέπει να χρησιμοποιούνται συμπληρωματικές φράσεις κινδύνου σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια (με βάση εμπειρίες ληφθείσες κατά τη σύνταξη του παραρτήματος I).

R 29 Σε επαφή με το νερό ελευθερώνονται τοξικά αέρια

Για ουσίες και παρασκευάσματα που όταν έλθουν σε επαφή με νερό ή υγρό αέρα εκλύουν πολύ τοξικά/τοξικά αέρια σε ενδεχομένως επικίνδυνες ποσότητες: π.χ. φωσφίδιο του αργιλίου, πενταθειούχος φωσφόρος.

R 31 Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται τοξικά αέρια

Για ουσίες και παρασκευάσματα που αντιδρούν με οξέα και εκλύουν τοξικά αέρια σε επικίνδυνες ποσότητες: π.χ. υποχλωριώδες νάτριο, πολυθειούχο βάριο. Για ουσίες που χρησιμοποιούνται από το ευρύ κοινό, η χρησιμοποίηση της φράσης S 50 [να μην αναμειγνύεται με ... (προσδιορίζεται από τον παραγωγό)] αρμόζει περισσότερο.

R 32 Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια

Για ουσίες και παρασκευάσματα που αντιδρούν με οξέα και εκλύουν πολύ τοξικά αέρια σε επικίνδυνες ποσότητες: π.χ. άλατα υδροκυανίου οξέος, νατραζίδιο. Για ουσίες που χρησιμοποιούνται από το ευρύ κοινό, η χρησιμοποίηση της φράσης S 50 [να μην αναμειγνύεται με ... (προσδιορίζεται από τον παραγωγό)] αρμόζει περισσότερο.

R 33 Κίνδυνος αθροιστικών επιδράσεων

Για ουσίες και παρασκευάσματα που μπορούν να συσσωρευτούν στον ανθρώπινο οργανισμό και προκαλούν ενδεχομένως ανησυχία, που εντούτοις δεν αρκεί για να δικαιολογήσει τη χρήση της R 48.

R 64 Μπορεί να βλάψει τα βρέφη που τρέφονται με μητρικό γάλα

Για ουσίες και παρασκευάσματα που λαμβάνονται από γυναίκες και ενδέχεται να έχουν επίδραση στη γαλουχία ή να ανευρεθούν (συμπεριλαμβανομένων των μεταβολιτών τους) στο μητρικό γάλα σε ποσότητες ανησυχητικές για την υγεία του βρέφους που θηλάζει.

Σχόλια για τη χρήση αυτής της φράσης R (και σε ορισμένες περιπτώσεις της φράσης R 33) παρατίθενται στο σημείο 4.2.3.3.

R 66 Επανεπιλημμένη έκθεση μπορεί να προκαλέσει ξηρότητα ή σκάσιμο του δέρματος

Για ουσίες και παρασκευάσματα που μπορεί να εμπνεύσουν ανησυχία λόγω πρόκλησης ξηρότητας, απολέπισης ή σκασίματος του δέρματος αλλά που δεν πληρούν τα κριτήρια για την R 38:

με βάση:

- είτε παρατηρήσεις στην πράξη έπειτα από συνήθη χειρισμό και χρήση,
- είτε σχετικές ενδείξεις όσον αφορά τα προβλεπόμενα αποτελέσματά τους στο δέρμα.

Βλέπε επίσης παραγράφους 1.6 και 1.7.

R 67 Οι ατμοί μπορεί να προκαλέσουν υπνηλία και ζάλη

Για πτητικές ουσίες και παρασκευάσματα που περιέχουν τέτοιες ουσίες που προκαλούν σαφή συμπτώματα κατάπτωσης του κεντρικού νευρικού συστήματος μετά από εισπνοή και που δεν είναι ήδη ταξινομημένες για οξεία τοξικότητα από εισπνοή (R 20, R 23, R 26, R 40/20, R 39/23 ή R 39/26).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ακόλουθες ενδείξεις:

- α) Στοιχεία από μελέτες σε ζώα που δείχνουν σαφή σημεία κατάπτωσης του ΚΝΣ όπως νάρκωση, λήθαργο, έλλειψη συντονισμού (συμπεριλαμβανομένης της απώλειας των αντανακλαστικών ισορροπήσης) και αταξία:
- είτε σε συγκεντρώσεις/χρόνους έκθεσης που δεν υπερβαίνουν τα 20 mg/l/4 ώρες
 - είτε για τις οποίες ο λόγος της επιδρώσας συγκέντρωσης σε χρόνο ≤ 4 ώρες προς τη συγκέντρωση κορεσμένων ατμών (ΣΚΑ) στους 20°C είναι $\leq 1/10$.
- β) Πρακτικές εμπειρίες από ανθρώπους (π.χ. νάρκωση, υπνηλία, μειωμένη αντίδραση, απώλεια ανακλαστικών, έλλειψη συντονισμού, ίλιγγοι) βάσει καλά τεκμηριωμένων αναφορών υπό συγκρίσιμες συνθήκες έκθεσης με τα αποτελέσματα που καθορίστηκαν παραπάνω σε ζώα.

Βλέπε επίσης παραγράφους 1.6 και 1.7.

Για άλλες συμπληρωματικές φράσεις κινδύνου βλέπε 2.2.6.

- 4.1.2. Εάν ένας παραγωγός, διανομέας ή εισαγωγέας διαθέτει πληροφορίες που δείχνουν ότι μια ουσία θα πρέπει να ταξινομηθεί και να επισημανθεί σύμφωνα με τα κριτήρια που προβλέπονται στα σημεία 4.2.1, 4.2.2 ή 4.2.3, πρέπει να επισημαίνει προσωρινά την ουσία σύμφωνα με αυτά τα κριτήρια επί τη βάσει αξιολόγησης των ενδείξεων από αρμόδιο άτομο.
- 4.1.3. Ο παραγωγός, διανομέας ή εισαγωγέας υποβάλλει το ταχύτερο δυνατό έγγραφο που συνοψίζει όλες τις σχετικές πληροφορίες σε ένα κράτος μέλος στην αγορά του οποίου διατίθεται η ουσία. Το συνοπτικό αυτό έγγραφο πρέπει να περιέχει βιβλιογραφία με όλες τις σχετικές παραπομπές, περιλαμβανομένων και τυχόν μη δημοσιευμένων σχετικών δεδομένων.
- 4.1.4. Επιπλέον, κάθε παραγωγός, διανομέας ή εισαγωγέας που διαθέτει νέα στοιχεία σχετικά με την ταξινόμηση και επισημάνση μιας ουσίας σύμφωνα με τα κριτήρια που αναφέρονται στα σημεία 4.2.1, 4.2.2 ή 4.2.3, πρέπει να υποβάλλει τα δεδομένα αυτά, το ταχύτερο δυνατό, σε ένα κράτος μέλος στην αγορά του οποίου κυκλοφορεί η ουσία.
- 5.2.2. *Μη υδάτινο περιβάλλον*
- 5.2.2.1. Οι ουσίες ταξινομούνται ως επικίνδυνες για το περιβάλλον και χαρακτηρίζονται με το σύμβολο "N", την κατάλληλη ένδειξη κινδύνου και τις κατάλληλες φράσεις κινδύνου, σύμφωνα με τα παρακάτω κριτήρια:
- R 54: Τοξικό για τη χλωρίδα
- R 55: Τοξικό για την πανίδα
- R 56: Τοξικό για τους οργανισμούς του εδάφους
- R 57: Τοξικό για τις μέλισσες
- R 58: Μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον.
- Ουσίες οι οποίες με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τις ιδιότητές τους, τη σταθερότητά τους, τη δυνατότητά τους να συσσωρεύονται και την προβλεπόμενη ή παρατηρούμενη περιβαλλοντική τους πορεία και συμπεριφορά, μπορεί να ενέχουν άμεσο ή μακροπρόθεσμο ή/και ύστερο κίνδυνο για τη δομή ή/και λειτουργία των φυσικών οικοσυστημάτων, εκτός εκείνων που καλύπτονται από το σημείο 5.2.1 παραπάνω. Λεπτομερή κριτήρια θα εκπονηθούν αργότερα.
- 5.2.2.2. Οι ουσίες ταξινομούνται ως επικίνδυνες για το περιβάλλον και χαρακτηρίζονται με το σύμβολο "N", την κατάλληλη ένδειξη κινδύνου και τις κατάλληλες φράσεις κινδύνου σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:
- R 59: Επικίνδυνο για τη στιβάδα του όζοντος.

Ουσίες οι οποίες με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία σχετικά με τις ιδιότητές τους και την προβλεπόμενη ή παρατηρούμενη περιβαλλοντική τους πορεία και συμπεριφορά μπορεί να ενέχουν κίνδυνο για τη δομή ή/και λειτουργία της στιβάδας του στρατοσφαιρικού όζοντος. Σε αυτές περιλαμβάνονται ουσίες που απαριθμούνται στο παράρτημα I του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 3093/94 του Συμβουλίου για τις ουσίες που καταστρέφουν τη στιβάδα του όζοντος (ΕΕ L 333 της 22.12.1994, σ. 1) και των μεταγενέστερων τροποποιήσεών του.

6.2. Φράσεις οδηγίων ασφαλούς χρήσης για ουσίες και παρασκευάσματα**S 1 Να φυλάσσεται κλειδομένο**

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές, τοξικές και διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τις ανωτέρω ουσίες και παρασκευάσματα όταν πωλούνται στο ευρύ κοινό.

S 2 Μακριά από παιδιά

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα που πωλούνται στο ευρύ κοινό, με εξαίρεση εκείνες που ταξινομούνται μόνο ως επικίνδυνες για το περιβάλλον.

S 3 Να φυλάσσεται σε δροσερό μέρος

- Εφαρμογή:
 - σε οργανικά υπεροξειδία,
 - σε άλλες επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα με σημείο ζέσεως $\leq 40^{\circ}\text{C}$.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για οργανικά υπεροξειδία, εκτός εάν χρησιμοποιείται η φράση S 47,
 - συνιστάται για άλλες επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα με σημείο ζέσεως μικρότερο ή ίσο των 40°C .

S 4 Μακριά από κατοικημένους χώρους

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές και τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε πολύ τοξικές και τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα όταν είναι σκόπιμο να συμπληρωθεί τη φράση S 13, π.χ. όταν υπάρχει κίνδυνος εισπνοής και η ουσία ή το παρασκεύασμα πρέπει να αποθηκευθεί μακριά από κατοικημένους χώρους. Οι οδηγίες δεν αποσκοπούν στο να αποκλείσουν την ενδεχόμενη χρησιμοποίηση της ουσίας ή του παρασκευάσματος σε κατοικημένους χώρους.

S 5 Να διατηρείται το περιεχόμενο μέσα σε ... (το είδος του κατάλληλου υγρού καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε αυτοαναφλεγόμενες στερεές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε ειδικές περιπτώσεις π.χ. για το νάτριο, το κάλιο ή τον λευκό φωσφόρο.

S 6 Να διατηρείται σε ατμόσφαιρα ... (το είδος του αδρανούς αερίου καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα που πρέπει να διατηρούνται σε ατμόσφαιρα αδρανούς αερίου.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε ειδικές περιπτώσεις, π.χ. ορισμένες οργανομεταλλικές ενώσεις.

S 7 Ο περιέκτης να διατηρείται ερμητικά κλειστός

- Εφαρμογή:
 - σε οργανικά υπεροξειδία,
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που εκλύουν πολύ τοξικά, τοξικά επιβλαβή ή εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια,
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που, όταν βρεθούν σε επαφή με υγρασία, εκλύουν εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια,
 - σε πολύ εύφλεκτα στερεά.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τα οργανικά υπεροξειδία,
 - συνιστάται και για τα άλλα πεδία εφαρμογής που αναφέρονται παραπάνω.

S 8 Ο περιέκτης να προστατεύεται από την υγρασία

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που μπορεί να αντιδράσουν ισχυρά με το νερό,
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα τα οποία, όταν έρχονται σε επαφή με το νερό, ελευθερώνουν εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια,
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα τα οποία, σε επαφή με το νερό, ελευθερώνουν πολύ τοξικά ή τοξικά αέρια.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται στα πεδία εφαρμογής που αναφέρονται παραπάνω, όταν χρειάζεται να ενισχυθεί η προειδοποίηση που δίδεται από τις φράσεις R 14, R 15 και ιδίως R 29.

S 9 Ο περιέκτης να διατηρείται σε καλά αεριζόμενο μέρος

- Εφαρμογή:
 - σε πτητικές ουσίες και παρασκευάσματα που μπορούν να εκλύουν πολύ τοξικούς, τοξικούς ή επιβλαβείς ατμούς,
 - σε εξαιρετικά εύφλεκτα ή πολύ εύφλεκτα υγρά και εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για πτητικές ουσίες και παρασκευάσματα που μπορούν να εκλύουν πολύ τοξικούς, τοξικούς ή επιβλαβείς ατμούς,
 - συνιστάται για εξαιρετικά εύφλεκτα ή πολύ εύφλεκτα υγρά ή εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια.

S 12 Μη διατηρείτε τον περιέκτη ερμητικά κλεισμένο

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που, με την έκλυση αερίων ή ατμών, μπορούν να διαρρήξουν το δοχείο.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται στις ειδικές περιπτώσεις που αναφέρονται παραπάνω.

S 13 Μακριά από τρόφιμα, ποτά και ζωοτροφές

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές, τοξικές και επιβλαβείς ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται όταν οι ουσίες και παρασκευάσματα αυτά ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό.

S 14 Μακριά από ... (ασύμβατα υλικά που υποδεικνύονται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε οργανικά υπεροξειδία.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική και κατά κανόνα περιοριζόμενη στα οργανικά υπεροξειδία. Εντούτοις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εξαιρετικές περιπτώσεις όταν η ασυμβατότητα είναι δυνατόν να προκαλέσει ιδιαίτερο κίνδυνο.

S 15 Μακριά από θερμότητα

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα τα οποία μπορούν να αποσυντεθούν ή μπορεί να αντιδράσουν αυθόρμητα υπό την επίδραση της θερμότητας.
- Κριτήρια χρήσης:
 - περιορίζεται κανονικά σε ειδικές περιπτώσεις, π.χ. μονομερή, αλλά δεν χρησιμοποιείται εάν έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί οι φράσεις κινδύνου R 2, R 3 ή/και R 5.

S 16 Μακριά από πηγές ανάφλεξης — Απαγορεύεται το κάπνισμα

- Εφαρμογή:
 - σε εξαιρετικά εύφλεκτα ή πολύ εύφλεκτα υγρά και εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για τις ουσίες και παρασκευάσματα που αναφέρονται παραπάνω αλλά δεν χρησιμοποιείται εάν έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί οι φράσεις κινδύνου R 2, R 3 ή/και R 5.

S 17 Μακριά από καύσιμα υλικά

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που μπορούν να σχηματίσουν εκρηκτικά ή αυτοαναφλεγόμενα μείγματα με τα καύσιμα υλικά.
- Κριτήρια χρήσης:
 - μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ειδικές περιπτώσεις, π.χ. για να δώσει έμφαση στις φράσεις κινδύνου R 8 και R 9.

S 18 Χειριστείτε και ανοίξτε τον περιέκτη προσεκτικά

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που υπάρχει κίνδυνος να δημιουργήσουν υπερπίεση στο δοχείο,
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που μπορούν να σχηματίσουν εκρηκτικά υπεροξειδία.
- Κριτήρια χρήσης:
 - περιορίζεται κανονικά στις περιπτώσεις που αναφέρονται παραπάνω, όταν υπάρχει κίνδυνος βλάβης στα μάτια ή/και όταν οι ουσίες και τα παρασκευάσματα αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό.

S 20 Μην τρώτε ή πίνετε όταν το χρησιμοποιείτε

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές, τοξικές και διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - περιορίζεται κανονικά σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. αρσενικό και ενώσεις αρσενικού, φθοροξεικές ενώσεις), ιδίως όταν κάποιο από τα υλικά αυτά μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το ευρύ κοινό.

S 21 Μην καπνίζετε όταν το χρησιμοποιείτε

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που παράγουν τοξικά προϊόντα κατά την καύση.
- Κριτήρια χρήσης:
 - περιορίζεται κανονικά σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. αλογονωμένες ενώσεις).

S 22 Μην αναπνέετε τη σκόνη

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις στερεές επικίνδυνες, ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τις προαναφερόμενες ουσίες και παρασκευάσματα για τις οποίες χρησιμοποιείται η φράση κινδύνου R 42,
 - συνιστάται για τις προαναφερόμενες ουσίες και παρασκευάσματα που διατίθενται υπό μορφή εισπνεύσιμης σκόνης ενώ οι κίνδυνοι για την υγεία από την εισπνοή της σκόνης αυτής δεν είναι γνωστοί.

S 23 Μην αναπνέετε αέρια/αναθυμάσεις/ατμούς/εκνεφώματα (η κατάλληλη διατύπωση καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις υγρές ή αέριες επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τις προαναφερόμενες ουσίες και παρασκευάσματα για τις οποίες χρησιμοποιείται η φράση κινδύνου R 42,
 - υποχρεωτική για τις ουσίες και παρασκευάσματα που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν με ψεκασμό. Οι φράσεις S 38 ή S 51 πρέπει να χρησιμοποιηθούν συμπληρωματικά,
 - συνιστάται όταν είναι αναγκαίο να εφιστάται η προσοχή του χρήστη σε κινδύνους από την εισπνοή, που δεν αναφέρονται στις φράσεις κινδύνου που πρέπει να χρησιμοποιούνται.

S 24 Αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις ουσίες και παρασκευάσματα που είναι επικίνδυνα για την υγεία.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τις ουσίες και παρασκευάσματα που συνοδεύονται από τη φράση R 43, εκτός κι αν συνυπάρχει και η φράση S 36,
 - συνιστάται όταν είναι αναγκαίο να εφιστάται η προσοχή του χρήστη σε κινδύνους από την επαφή με το δέρμα που δεν αναφέρονται στις φράσεις κινδύνου (π.χ. παραισθησία) που πρέπει να χρησιμοποιούνται. Εντούτοις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδώσει έμφαση σε τέτοιες φράσεις κινδύνου.

S 25 Αποφεύγετε την επαφή με τα μάτια

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις ουσίες και παρασκευάσματα που είναι επικίνδυνα για την υγεία.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται όταν είναι αναγκαίο να εφιστάται η προσοχή του χρήστη σε κινδύνους από την επαφή με τα μάτια που δεν αναφέρονται στις φράσεις κινδύνου που πρέπει να χρησιμοποιούνται. Εντούτοις, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδώσει έμφαση σε τέτοιες φράσεις κινδύνου,
 - συνιστάται για ουσίες που συνοδεύονται από τις φράσεις R 34, R 35, R 36 ή R 41 που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό.

S 26 Σε περίπτωση επαφής με τα μάτια, πλύνετε τα αμέσως με άφθονο νερό και ζητήστε ιατρική συμβουλή

- Εφαρμογή:
 - σε διαβρωτικές ή ερεθιστικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα και για εκείνες για τις οποίες προβλέπεται ότι πρέπει να συνοδεύονται από τη φράση R 41,
 - συνιστάται για ερεθιστικές ουσίες και παρασκευάσματα και για εκείνες για τις οποίες προβλέπεται ότι πρέπει να συνοδεύονται από τη φράση κινδύνου R 36.

S 27 Αφαιρέστε αμέσως όλα τα ενδύματα που έχουν μολυνθεί

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές, τοξικές ή διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για πολύ τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα που συνοδεύονται από τη φράση R 27 και που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό,
 - συνιστάται για πολύ τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα που συνοδεύονται από τη φράση R 27 και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. Εντούτοις, αυτή η φράση ασφαλούς χρήσης δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται εφόσον υπάρχει η S 36,
 - συνιστάται για πολύ τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα που συνοδεύονται από τη φράση R 24 καθώς και για διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό.

S 28 Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλυθείτε αμέσως με άφθονο ... (το είδος του υγρού καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές, τοξικές ή διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για πολύ τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα,
 - συνιστάται για τις άλλες ουσίες και παρασκευάσματα που αναφέρονται παραπάνω, ιδιαίτερα όταν το νερό δεν είναι το πλέον ενδεδειγμένο υγρό έκπλυσης,
 - συνιστάται για διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό.

S 29 Μην αδειάζετε το περιεχόμενο στην αποχέτευση

- Εφαρμογή:
 - σε εξαιρετικά ή πολύ εύφλεκτα υγρά που δεν αναμειγνύονται με το νερό,
 - σε πολύ τοξικές και τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα,
 - σε ουσίες επικίνδυνες για το περιβάλλον.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για ουσίες επικίνδυνες για το περιβάλλον και συνοδευόμενες από το σύμβολο "N", που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό, εκτός κι αν αυτή είναι η προβλεπόμενη χρήση,
 - συνιστάται για άλλες ουσίες και παρασκευάσματα που αναφέρονται παραπάνω που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό, εκτός κι αν αυτή είναι η προβλεπόμενη χρήση.

S 30 Μην προσθέτετε ποτέ νερό στο προϊόν αυτό

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που αντιδρούν βίαια με το νερό,
- Κριτήρια χρήσης:
 - περιορίζεται κανονικά σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. θειικό οξύ) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, κατά περίπτωση, για να δώσει τις σαφέστερες δυνατές πληροφορίες, είτε για να προσδώσει έμφαση στη φράση R 14 είτε ως εναλλακτική αντί της R 14.

S 33 Λάβετε προστατευτικά μέτρα έναντι ηλεκτροστατικών εκκενώσεων

- Εφαρμογή:
 - σε εξαιρετικά ή πολύ εύφλεκτες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για ουσίες και παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία και οι οποίες δεν απορροφούν υγρασία. Στην πράξη δεν χρησιμοποιείται ποτέ για ουσίες και παρασκευάσματα που διατίθενται στην αγορά για χρήση από το ευρύ κοινό.

S 35 Το υλικό και ο περιέκτης του πρέπει να απορρίπτονται με ασφαλή τρόπο

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για ουσίες και παρασκευάσματα για τα οποία απαιτούνται ειδικές οδηγίες για να διασφαλιστεί ή σωστή τελική διάθεσή τους.

S 36 Να φοράτε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία

- Εφαρμογή:
 - σε οργανικά υπεροξειδία,
 - σε πολύ τοξικές, τοξικές ή επιβλαβείς ουσίες και παρασκευάσματα,
 - σε διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τις πολύ τοξικές και διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα,
 - υποχρεωτική για τις ουσίες και παρασκευάσματα για τα οποία χρησιμοποιούνται οι φράσεις κινδύνου R 21 ή R 24,
 - υποχρεωτική για τις καρκινογόνες, τις μεταλλαξιογόνες και τις τοξικές για την αναπαραγωγή ουσίες της κατηγορίας 3 εκτός αν οι επιπτώσεις προκαλούνται μόνον κατόπιν εισπνοής της ουσίας ή του παρασκευάσματος,
 - υποχρεωτική για τα οργανικά υπεροξειδία,
 - συνιστάται για τις τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα όταν η τιμή LD₅₀ δερματικής τοξικότητας δεν είναι γνωστή, αλλά η ουσία ή το παρασκεύασμα ενδέχεται να είναι τοξικά σε επαφή με το δέρμα,
 - συνιστάται για τις ουσίες και τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία και μπορούν να βλάψουν την υγεία μετά από παρατεταμένη έκθεση σε αυτές.

S 37 Να φοράτε κατάλληλα γάντια

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές, τοξικές, επιβλαβείς ή διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα,
 - σε οργανικά υπεροξειδία,
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που ερεθίζουν το δέρμα ή προκαλούν ευαισθητοποίηση από την επαφή με το δέρμα.

- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για πολύ τοξικές και διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα,
 - υποχρεωτική για ουσίες και παρασκευάσματα που συνοδεύονται από τις R 21, R 24 ή R 43,
 - υποχρεωτική για τις καρκινογόνες, μεταλλαξιογόνες και τοξικές για την αναπαραγωγή ουσίες της κατηγορίας 3 εκτός αν τα αποτελέσματα επέρχονται αποκλειστικά κατόπιν εισπνοής των ουσιών και παρασκευασμάτων,
 - υποχρεωτική για οργανικά υπεροξειδία,
 - συνιστάται για τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα όταν η τιμή LD₅₀ δερματικής τοξικότητας είναι άγνωστη αλλά η ουσία ή το παρασκευάσμα είναι πιθανόν να αποδειχθούν επιβλαβή κατά την επαφή με το δέρμα,
 - συνιστάται για ουσίες και παρασκευάσματα ερεθιστικά για το δέρμα.

S 38 Σε περίπτωση ανεπαρκούς αερισμού, χρησιμοποιείτε κατάλληλη αναπνευστική συσκευή

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές ή τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε ειδικές περιπτώσεις που συνεπάγονται τη χρήση πολύ τοξικών ή τοξικών ουσιών και παρασκευασμάτων στη βιομηχανία ή τη γεωργία.

S 39 Χρησιμοποιείτε μέσα προστασίας των ματιών/του προσώπου

- Εφαρμογή:
 - σε οργανικά υπεροξειδία,
 - σε διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα, περιλαμβανομένων των ερεθιστικών που ενέχουν σοβαρούς κινδύνους για τα μάτια,
 - σε πολύ τοξικές και τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για ουσίες και παρασκευάσματα για τις οποίες χρησιμοποιούνται οι φράσεις R 34, R 35 ή R 41,
 - υποχρεωτική για τα οργανικά υπεροξειδία,
 - συνιστάται όταν πρέπει να εφιστάται η προσοχή του χρήστη σε κινδύνους από την επαφή με τα μάτια οι οποίοι δεν αναφέρονται στις χρησιμοποιούμενες φράσεις κινδύνου,
 - κανονικά περιορίζεται σε εξαιρετικές περιπτώσεις για τις πολύ τοξικές ή τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα, όταν υπάρχει κίνδυνος βίαιας εκτοξεύσεως σταγονιδίων και είναι δυνατόν να απορροφηθούν εύκολα από το δέρμα.

S 40 Για τον καθαρισμό του δαπέδου και όλων των αντικειμένων που έχουν μολυνθεί από το υλικό αυτό χρησιμοποιείτε ... (το είδος καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε εκείνες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα, για τις οποίες το νερό δεν θεωρείται το κατάλληλο μέσο καθαρισμού (π.χ. όταν είναι απαραίτητη η απορρόφηση από υλικό σε μορφή σκόνης, ή διάλυση με διαλύτη) και όπου είναι σημαντικό για την υγεία ή/και για λόγους ασφαλείας να υπάρχει προειδοποίηση στην ετικέτα.

S 41 Σε περίπτωση πυρκαγιάς ή/και έκρηξης μην αναπνέετε τους καπνούς

- Εφαρμογή:
 - σε επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα που κατά την καύση αναδίδουν πολύ τοξικά ή τοξικά αέρια.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε ειδικές περιπτώσεις.

S 42 Κατά τη διάρκεια υποκαπνισμού/ψεκασμού χρησιμοποιείτε κατάλληλη αναπνευστική συσκευή (η κατάλληλη διατύπωση καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που προορίζονται για τέτοια χρήση, αλλά που μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία και την ασφάλεια του χρήστη, εκτός αν ληφθούν οι κατάλληλες προφυλάξεις.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε ειδικές περιπτώσεις.

S 43 Σε περίπτωση πυρκαγιάς χρησιμοποιείτε ... (αναφέρεται το ακριβές είδος μέσων πυρόσβεσης. Εάν το νερό αυξάνει τον κίνδυνο προστίθεται: Μη χρησιμοποιείτε ποτέ νερό)

- Εφαρμογή:
 - σε εξαιρετικά εύφλεκτες, πολύ εύφλεκτες και εύφλεκτες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για ουσίες και παρασκευάσματα που, σε επαφή με το νερό ή με υγρό αέρα, εκλύουν εξαιρετικά εύφλεκτα αέρια,
 - συνιστάται για εξαιρετικά εύφλεκτες, πολύ εύφλεκτες και εύφλεκτες ουσίες και παρασκευάσματα, ιδίως όταν δεν αναμειγνύονται με το νερό.

S 45 Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθανθείτε αδιαθεσία ζητείστε αμέσως ιατρική συμβουλή (δείξτε την ετικέτα αν είναι δυνατόν)

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα,
 - σε τοξικές και διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα,
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που προκαλούν ευαισθητοποίηση από εισπνοή.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τις ουσίες και παρασκευάσματα που αναφέρονται ανωτέρω.

S 46 Σε περίπτωση κατάποσης ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή και δείξτε αυτό τον περιέκτη ή την ετικέτα

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα, εκτός από εκείνα που είναι πολύ τοξικά, τοξικά, διαβρωτικά ή επικίνδυνα για το περιβάλλον.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για όλες τις επικίνδυνες ουσίες και τα παρασκευάσματα που αναφέρονται παραπάνω και ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό, εκτός εάν δεν υπάρχει κανένας λόγος ανησυχίας για κάποιο κίνδυνο από κατάποση, ιδίως για τα παιδιά.

S 47 Να διατηρείται σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους ... °C (καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που καθίστανται ασταθή σε μια ορισμένη θερμοκρασία.
- Κριτήρια χρήσης:
 - περιορίζεται κανονικά, σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. ορισμένα οργανικά υπεροξειδία).

S 48 Να διατηρείται διαβρεγμένο με ... (το κατάλληλο υλικό καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που μπορούν να καταστούν πολύ ευαίσθητα σε σπινθήρες, τριβή ή πρόσκρουση, εάν αφεθούν να ξηρανθούν τελείως.
- Κριτήρια χρήσης:
 - κανονικά περιορίζεται σε ειδικές περιπτώσεις π.χ. νιτροκυτταρίνες.

S 49 Να διατηρείται μόνο μέσα στον αρχικό περιέκτη

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα ευαίσθητα σε καταλυτική διάσπαση.
- Κριτήρια χρήσης:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα ευαίσθητα σε καταλυτική διάσπαση π.χ. ορισμένα οργανικά υπεροξειδία.

S 50 Να μην αναμιχθεί με ... (καθορίζεται από τον παραγωγό)

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που αντιδρούν με το καθοριζόμενο προϊόν εκλύοντας πολύ τοξικά ή τοξικά αέρια,
 - σε οργανικά υπεροξειδία.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για ουσίες και παρασκευάσματα που αναφέρονται παραπάνω και που είναι πιθανό να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό, όταν αποτελεί καλύτερη εναλλακτική της R 31 ή R 32,
 - υποχρεωτική για ορισμένα υπεροξειδία που μπορούν να αντιδράσουν ισχυρά με επιταχυντές ή προωθητές.

S 51 Να χρησιμοποιείται μόνο σε καλά αεριζόμενο χώρο

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που είναι πιθανόν ή προορίζονται να παράγουν ατμούς ή σκόνη, εκνεφώματα, αναθυμιάσεις, ομίχλη κ.λπ., που ενέχουν κινδύνους σε περίπτωση εισπνοής ή κίνδυνο πυρκαγιάς ή έκρηξης.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται όταν η χρήση της φράσης S 38 δεν είναι κατάλληλη. Έχει μεγάλη σημασία όταν οι ουσίες και τα παρασκευάσματα αυτά είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό.

S 52 Δεν συνιστάται η χρήση σε ευρείες επιφάνειες σε εσωτερικούς χώρους

- Εφαρμογή:
 - σε πτητικές, πολύ τοξικές, τοξικές και βλαβερές ουσίες και παρασκευάσματα που τις περιέχουν.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται όταν είναι πιθανό να προκληθεί βλάβη στην υγεία από παρατεταμένη έκθεση σε αυτές τις ουσίες και λόγω της εξαέρωσής τους από μεγάλες επιφάνειες στο σπίτι ή σε άλλους κλειστούς χώρους όπου συγκεντρώνονται άτομα.

S 53 Αποφύγετε την έκθεση. Εφοδιαστείτε με τις ειδικές οδηγίες πριν από τη χρήση

- Εφαρμογή:
 - σε καρκινογόνες, μεταλλαξιγόνες ή/και τοξικές στην αναπαραγωγή ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για τις ουσίες και τα παρασκευάσματα που αναφέρονται παραπάνω και που συνοδεύονται από, τουλάχιστον, μία από τις ακόλουθες φράσεις: R 45, R 46, R 49, R 60 ή R 61.

S 56 Το υλικό αυτό και ο περιέκτης του να εναποτεθούν σε χώρο συλλογής επικίνδυνων ή ειδικών αποβλήτων

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό και για τις οποίες απαιτείται ειδικός τρόπος διάθεσης.

S 57 Να χρησιμοποιηθεί κατάλληλο περιβλήμα για να αποφευχθεί η ρύπανση του περιβάλλοντος

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες στις οποίες έχει αποδοθεί το σύμβολο “N”.
- Κριτήρια χρήσης:
 - περιορίζεται κανονικά σε ουσίες που δεν είναι πιθανό να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό.

S 59 Ζητείστε πληροφορίες υπό τον παραγωγό/προμηθευτή για ανάκτηση/ανακύκλωση

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για ουσίες επικίνδυνες για τη στιβάδα του όζοντος,
 - συνιστάται για άλλες ουσίες και παρασκευάσματα για τις οποίες συνιστάται ανάκτηση/ανακύκλωση.

S 60 Το υλικό αυτό και ο περιέκτης του να θεωρηθούν κατά τη διάθεσή τους ως επικίνδυνα απόβλητα

- Εφαρμογή:
 - σε όλες τις επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για ουσίες και παρασκευάσματα που δεν είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό και δεν συνοδεύονται από την S 35.

S 61 Αποφύγετε την ελευθέρωσή του στο περιβάλλον. Αναφερθείτε σε ειδικές οδηγίες/δελτίο δεδομένων ασφαλείας

- Εφαρμογή:
 - σε επικίνδυνες για το περιβάλλον ουσίες.
- Κριτήρια χρήσης:
 - χρησιμοποιείται κανονικά για ουσίες στις οποίες έχει αποδοθεί το σύμβολο “N”,
 - συνιστάται για όλες τις ουσίες που έχουν ταξινομηθεί ως επικίνδυνες για το περιβάλλον και που δεν καλύπτονται από τα παραπάνω.

S 62 Σε περίπτωση κατάποσης, να μην προκληθεί εμετός: ζητείστε αμέσως ιατρική συμβουλή και δείξτε αυτό το δοχείο ή την ετικέτα του

- Εφαρμογή:
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που ταξινομούνται ως επιβλαβή και συνοδεύονται από την R 65 σύμφωνα με τα κριτήρια του 3.2.3,
 - δεν εφαρμόζεται σε ουσίες και παρασκευάσματα που διατίθενται στην αγορά σε περιέκτες αερολυμάτων (ή σε περιέκτες που φέρουν στεγανοποιημένο προσάρτημα ψεκασμού), βλ. σημεία 8 και 9.
- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για ουσίες και παρασκευάσματα που αναφέρονται ανωτέρω, εάν πωλούνται ή είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό, εκτός κι αν είναι υποχρεωτική η S 45 ή η S 46,
 - συνιστάται για τις ουσίες και παρασκευάσματα που αναφέρονται ανωτέρω όταν χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, εκτός κι αν είναι υποχρεωτική η S 45 ή η S 46.

S 63 Σε περίπτωση ατυχήματος λόγω εισπνοής: μεταφέρετε το θύμα στον καθαρό αέρα και αφήστε το να ηρεμήσει

- Εφαρμογή:
 - σε πολύ τοξικές και τοξικές ουσίες και παρασκευάσματα (αέρια, ατμοί, σωματίδια, πτητικά υγρά),
 - σε ουσίες και παρασκευάσματα που προκαλούν ευαισθητοποίηση του αναπνευστικού συστήματος.

- Κριτήρια χρήσης:
 - υποχρεωτική για ουσίες και παρασκευάσματα που συνοδεύονται από τις φράσεις R 26, R 23 ή R 42 και είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό με τρόπο που μπορεί να οδηγήσει σε εισπνοή τους.

S 64 Σε περίπτωση κατάποσης, πλύνετε το στόμα με νερό (μόνο εφόσον το άτομο διατηρεί τις αισθήσεις του)

- Εφαρμογή:
 - σε διαβρωτικές ή ερεθιστικές ουσίες και παρασκευάσματα.
- Κριτήρια χρήσης:
 - συνιστάται για τις ανωτέρω ουσίες και παρασκευάσματα που είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθούν από το ευρύ κοινό και όπου αρμόζει η ανωτέρω αγωγή.

7.5.2. *Επιλογή φράσεων ασφαλούς χρήσης*

Η τελική επιλογή των φράσεων ασφαλούς χρήσης πρέπει να γίνεται έχοντας υπόψη τις φράσεις κινδύνου που αναγράφονται στην ετικέτα και την προβλεπόμενη χρήση της ουσίας ή του παρασκευάσματος:

- κατά γενικό κανόνα, τέσσερις, κατ' ανώτατο όριο, φράσεις S αρκούν για τη διατύπωση των καταλληλότερων οδηγιών ασφαλούς χρήσης. Για το σκοπό αυτό, οι συνδυασμένες φράσεις που περιλαμβάνονται στο παράρτημα IV θεωρούνται ως μία φράση
- στην περίπτωση φράσεων S σχετικών με την τελική διάθεση, πρέπει να χρησιμοποιείται μία φράση S, εκτός κι αν είναι σαφές ότι η διάθεση του υλικού και του περιέκτη του δεν συνιστά κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία ή το περιβάλλον. Συμβουλές για την ασφαλή διάθεση είναι σημαντικές, ιδιαίτερα, για ουσίες και παρασκευάσματα που πωλούνται στο ευρύ κοινό
- ορισμένες φράσεις R καθίστανται περιττές εάν έχει γίνει προσεκτική επιλογή των φράσεων S και αντιστρόφως. Φράσεις S οι οποίες αντιστοιχούν εμφανώς σε φράσεις R θα εμφανίζονται στην ετικέτα μόνον εάν επιζητείται να δοθεί έμφαση σε μία συγκεκριμένη προειδοποίηση
- κατά την επιλογή των φράσεων ασφαλούς χρήσης, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίδεται στις προβλεπόμενες συνθήκες χρήσεως ορισμένων ουσιών και παρασκευασμάτων, π.χ. ψεκασμός ή άλλοι τρόποι παραγωγής αερολυμάτων. Οι φράσεις θα πρέπει να επιλέγονται έχοντας κατά νου την προβλεπόμενη χρήση
- οι φράσεις S 1, S 2 και S 45 είναι υποχρεωτικές για όλες τις πολύ τοξικές, τοξικές και διαβρωτικές ουσίες και παρασκευάσματα που πωλούνται στο ευρύ κοινό,
- οι φράσεις S 2 και S 46 είναι υποχρεωτικές για όλες τις υπόλοιπες επικίνδυνες ουσίες και παρασκευάσματα (εκτός από εκείνες που ταξινομούνται μόνον ως επικίνδυνες για το περιβάλλον) που πωλούνται στο ευρύ κοινό,

Όταν οι φράσεις που επιλέγονται σύμφωνα με τα αυστηρά κριτήρια του σημείου 6.2 οδηγούν σε πλεονασμό ή ασάφεια ή είναι σαφώς περιττές για το συγκεκριμένο προϊόν ή συσκευασία, τότε ορισμένες φράσεις μπορούν να απαλειφθούν.

8. ΕΙΔΙΚΕΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ: ΟΥΣΙΕΣ

8.1. **Φορητές οβίδες αερίων**

Για τις φορητές οβίδες αερίων οι απαιτήσεις επισημάνσεως θεωρείται ότι τηρούνται όταν συμφωνούν με τα προβλεπόμενα στο άρθρο 23 ή στο άρθρο 24 παράγραφος 6 στοιχείο β).

Ωστόσο, κατά παρέκκλιση του άρθρου 24 παράγραφοι 1 και 2, για τις οβίδες αερίων με χωρητικότητα ίση ή μικρότερη των 150 λίτρων νερού μπορεί να επιλεγεί μια από τις ακόλουθες εναλλακτικές λύσεις:

- η μορφή και οι διαστάσεις της ετικέτας μπορούν να είναι σύμφωνες με τις προδιαγραφές του προτύπου ISO/DP 7225,
- τα στοιχεία που καθορίζονται στο άρθρο 23 παράγραφος 2 μπορούν να παρέχονται σε σκληρό δίσκο ή ετικέτα στερεωμένη στην οβίδα.

8.2. Περιέκτες αερίου προοριζόμενοι για προπάνιο, βουτάνιο και υγραέριο (LPG)

Οι ανωτέρω ουσίες ταξινομούνται στο παράρτημα 1. Παρόλο που ταξινομούνται σύμφωνα με το άρθρο 2, δεν παρουσιάζουν κίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου όταν διατίθενται στην αγορά σε κλειστές επαναπληρούμενες κυλινδρικές φιάλες ή σε μη επαναπληρούμενα φιαλίδια μίας χρήσης κατά το πρότυπο EN 417, ως καύσιμα αέρια τα οποία ελευθερώνονται μόνο για καύση.

Αυτές οι φιάλες ή τα φιαλίδια πρέπει να επισημαίνονται με το κατάλληλο σύμβολο και τις φράσεις R και S που αφορούν την ευφλεκτότητα. Δεν απαιτούνται πληροφορίες για τις επιπτώσεις τους στην υγεία του ανθρώπου πάνω στην ετικέτα. Ωστόσο, ο υπεύθυνος για τη διάθεση της ουσίας στην αγορά οφείλει να ενημερώνει τους επαγγελματίες χρήστες, για τις επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου οι οποίες θα αναγράφονται στην ετικέτα, με τη μορφή που προβλέπεται στο άρθρο 27 της οδηγίας. Στους καταναλωτές πρέπει να παρέχονται επαρκείς πληροφορίες ώστε να τους επιτρέπουν να λαμβάνουν όλα τα αναγκαία μέτρα για την υγεία και την ασφάλειά τους, όπως προβλέπεται στην παράγραφο 3 του άρθρου 1 της οδηγίας 91/155/ΕΟΚ όπως τροποποιήθηκε από την οδηγία 93/112/ΕΟΚ.

8.3. Μέταλλα σε συμπαγή μορφή

Οι ουσίες αυτές ταξινομούνται στο παράρτημα I ή πρέπει να ταξινομούνται σύμφωνα με το άρθρο 6. Εντούτοις, ορισμένες από αυτές τις ουσίες, αν και ταξινομούνται σύμφωνα με το άρθρο 2 δεν παρουσιάζουν κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία από εισπνοή, κατάποση ή επαφή με το δέρμα ή για το υδάτινο περιβάλλον με τη μορφή που διατίθενται στην αγορά. Οι ουσίες αυτές δεν απαιτείται να φέρουν ετικέτα σύμφωνα με το άρθρο 23. Εντούτοις, όλες οι πληροφορίες που θα έπρεπε να εμφανίζονται στην ετικέτα πρέπει να παρέχονται στο χρήστη από τον υπεύθυνο για τη διάθεση του μετάλλου στην αγορά, με τρόπο που προβλέπεται στο άρθρο 27.

8.4. Ουσίες που ταξινομούνται με τη φράση R 65

Οι ουσίες που ταξινομούνται ως επιβλαβείς επειδή παρουσιάζουν κίνδυνο κατά την εισπνοή δεν απαιτείται να επισημαίνονται ως επιβλαβείς με R 65 εάν δεν διατίθενται στην αγορά σε περιέκτες αερολύματος ή σε περιέκτες με προσαρμοσμένο σφραγισμένο ψεκαστήρα.»
