

II

(Muud kui seadusandlikud aktid)

MÄÄRUSED

KOMISJONI MÄÄRUS (EL) nr 900/2014,

15. juuli 2014,

millega muudetakse tehnika arenguga kohandamise eesmärgil määrust (EÜ) nr 440/2008, millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Liidu toimimise lepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 18. detsembri 2006. aasta määrust (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ, ⁽¹⁾ eriti selle artikli 13 lõiget 2,

ning arvestades järgmist:

- (1) Komisjoni määruses (EÜ) nr 440/2008 ⁽²⁾ on esitatud katsemeetodid kemikaalide füüsilis-keemiliste omaduste, toksilisuse ja ökotoksilisuse määramiseks, mida kasutatakse määruse (EÜ) nr 1907/2006 kohaldamisel.
- (2) Määrust (EÜ) nr 440/2008 on vaja ajakohastada, et võtta tehnika arengu arvestamiseks prioriteetsena arvesse uusi ja ajakohastatud katsemeetodeid, mille OECD on hiljuti heaks kiitnud, ning vähendada kooskõlas Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga 2010/63/EL ⁽³⁾ teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade arvu. Käesoleva eelnõuga seoses on konsulteeritud sidusrühmadega.
- (3) Selline kohandamine tehnika arenguga hõlmab kuut uut määramismeetodit mürgisuse ja muude tervisemõjude kindlaks tegemiseks: arenguhäireid põhjustava neurotoksisilise uuring, laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksisilise uuring, transgeensete näriliste *in vivo* geenimutatsiooni katse, *in vitro* katse, millega hinnatakse mõju steroidhormoonide sünteesile, samuti kaks *in vivo* meetodit, millega hinnatakse östrogeenset või (anti)androgeenset mõju.
- (4) Seepärast tuleks määrust (EÜ) nr 440/2008 vastavalt muuta.
- (5) Käesoleva määrusega ette nähtud meetmed on kooskõlas määruse (EÜ) nr 1907/2006 artikli 133 kohaselt asutatud komitee arvamusega,

⁽¹⁾ ELTL 396, 30.12.2006, lk 1.

⁽²⁾ Komisjoni määrus (EÜ) nr 440/2008, 30. mai 2008, millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) (ELT L 142, 31.5.2008, lk 1).

⁽³⁾ Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EÜ) nr 440/2008 lisa muudetakse vastavalt käesoleva määruse lisale.

Artikkel 2

Käesolev määrus jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolev määrus on tervikuna siduv ja vahetult kohaldatav kõikides liikmesriikides.

Brüssel, 15. juuli 2014

Komisjoni nimel

president

José Manuel BARROSO

LISA

Määruse (EÜ) nr 440/2008 lisa muudetakse järgmiselt.

Lisatakse peatükid B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 ja B.58:

„B.53. ARENGUHÄIREID PÕHJUSTAVA NEUROTOKSILISUSE UURING

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 426 (2007). OECD paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse tööühma koosolekul Kopenhaagenis 1995. aasta juunis arutati, kas on vaja ajakohastada olemasolevaid OECD katsejuhendeid paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse määramiseks ja töötada välja uusi katsejuhendeid seni veel hõlmamata näitajate määramiseks (1). Töörühm soovitas koostada katsejuhendi arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse määramiseks, võttes aluseks USA keskkonnakaitsemeti (EPA) katsejuhendi, mis on hiljem läbi vaadatud (2). 1996. aasta juunis toimus Kopenhaagenis teine arutelu selleks, et koostada sekretariaadile suunised uue, arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse juhendi peamiste küsimuste kohta, sealhulgas näiteks loomaliigi valimise, doseerimisperioodi, hinnatavate näitajate ja tulemuste hindamise kriteeriumide kohta. Ameerika Ühendriikide suunised neurotoksilisuse riski hindamiseks avaldati 1998. aastal (3). Oktoobris 2000 toimusid üksteise järel OECD ekspertide koosolek ja ILSI (International Life Science Institute) riskihindamise seminar ning Tokyos peeti 2005. aastal ekspertide koosolek. Koosolekutel arutati seoses käesoleva katsemeetodi väljatöötamisega seniste katsejuhenditega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi ning koosolekute soovitusi (4, 5, 6, 7). Lisateavet käesoleva katsemeetodi kasutamise, tulemuste tõlgendamise ja kasutatud terminite kohta võib leida OECD juhenddokumendist nr 43 „Reproduktiivtoksilisuse määramine ja hindamine” (8) ning nr 20 „Neurotoksilisuse määramine” (9).

LÄHTEKAALUTLUSED

2. Paljud kemikaalid avaldavad inimesele ja muudele liikidele arenguhäireid põhjustavat neurotoksilist mõju (10, 11, 12, 13). Kemikaali toksiliste omaduste hindamisel võib olla vaja määrata arenguhäireid põhjustava neurotoksilise mõju võimalikkust. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu eesmärk on koguda andmeid mõju kohta, mida emakasisene või sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga avaldab järglaste arenevale närvisüsteemile; andmeid kogutakse doosi ja toime vahelise sõltuvuse, võimalike funktsionaalsete ja morfoloogiliste mõjude kohta.
3. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu võib teha eraldi või reproduktiivtoksilisuse ja/või neurotoksilisuse uuringu raames (nt katsejuhendid B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) või lisaks sünnieelseid arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringule (nt katsejuhend B.31 (17)). Kui arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust uuritakse muu uuringu raames, on tingimata vaja säilitada kummagi uuringutüübi terviklikkus. Kõik katsed peaksid olema kooskõlas kohaldatavate õigusaktidega või valitsuse ja institutsiooniliste suunistega katseloomade kasutamise kohta teadusuuringutes (nt 18).
4. Katselabor vaatab enne uuringu tegemist läbi ja võtab arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta. Selline teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali nimetus ja struktuur, füüsikalised-keemilised omadused, muud sama kemikaaliga *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemused, struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilised andmed ning kemikaali eeldatav(ad) kasutusala(d). Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks, ja aitab valida sobivat lähtedoosi.

KATSE PÕHIMÕTE

5. Katsekemikaali manustatakse loomadele tiinuse ja imetamise ajal. Katseid tehakse emasloomadega, et hinnata mõju tiinus- ja imetamisperioodil, ning katsed võivad hõlmata ka võrdleva teabe (emasloomad vs. nende järglased) hankimist. Järglased valitakse neurotoksilisuse hindamiseks pesakondadest juhuslikult. Hindamine hõlmab vaatlusi, et teha kindlaks suuri neuroloogilisi ja käitumuslikke kõrvalekaldeid; seejuures hinnatakse füüsilist arengut, käitumise ontogeneesi, motoorset aktiivsust, motoorseid ja sensoorseid funktsioone, õppimist ja mälu; samuti hinnatakse aju massi ja neuropatoloogiat sünnijärgse arengu käigus ja pärast täiskasvanuikka jõudmist.

6. Kui katsemeetodi alusel tehakse eraldi uuring, võib igas rühmas kasutada täiendavaid loomi, et teha konkreetseid neurokäitumuslikke uuringuid, neuropatoloogia, neurokeemia või elektrofüsioloogia uuringuid, millega võidakse täiendada käesoleva katsemeetodi kasutamise saadavaid andmeid (16, 19, 20, 21). Täiendavad uuringud võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused, oodatav mõju või toimetehhanism viitavad mingile konkreetsele neurotoksilisuse tüübile. Nende täiendavate katsete jaoks võib kasutada emasloomi ja poegi. Lisaks võib kasutada ka *ex vivo* või *in vitro* katseid, kui need katsed ei muuda *in vivo* katsete usaldusväärsust.

KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomaliigi valimine

7. Eelistatud liigiks on rott; sobivuse korral võib kasutada muid liike. Siiski tuleb silmas pidada, et lootelise ja sünnijärgse arengu kohta käesolevas katsemeetodis osutatud päevad kehtivad rottide sagedamini kasutatavate liinide puhul, ning kui kasutatakse muud loomaliiki või ebatavalist rotiliini, siis tuleb valida võrreldavad päevad. Muu liigi kasutamist tuleks põhjendada toksikoloogiliste, farmakokineetiliste ja/või muude andmete alusel. Põhjenduses tuleks viidata olemasolevatele liigispetsiifilise käitumise sünnijärgse arengu neuroloogia ja neuropatoloogia hinnanguitele. Kui varasemad katsed andsid muret tekitavaid tulemusi, tuleks kaaluda sama liigi/aretusliini kasutamist. Kuna erinevate liinide rottidel on erinevad omadused, tuleks tõendada, et kasutamiseks valitud liini rotid on piisava sigivuse ja reageerimisvõimega. Kui arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringus kasutatakse muud liiki, tuleb dokumentidega tõendada selle liigi tundlikkust ja saadavate tulemuste usaldusväärsust.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Valgustustsükli võib enne paaritamist ja uuringu kestuse ajaks muuta ka vastupidiseks, et funktsionaalseid ja käitumise näitajaid saaks hinnata pimedal perioodil (punase valguse juures), kui loomad on tavaliselt aktiivsed (22). Kui valguse ja pimeduse vaheldumise tsüklit muudetakse, tuleb ette näha vajalik kohanemisperiood, et loomad kohaneksid uue tsükliga. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut koos piiramatul hulgal joogiveega. Katseprotokollis esitatakse sööda ja vee tüüp ning nii sööda kui ka vee kohta tuleks teha saasteainete analüüs.
9. Loomi võib hoida puurides eraldi või väikestes, samast soost loomade rühmadena. Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Pärast toimunud paarituse tõendamist või hiljemalt tiinuse 15. päeval tuleks paaritatud loomad paigutada eraldi poegimispuuridesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Paaritunud emasloomadele antakse poegimisaja lähenemisel sobivad ja kindlaksmääratud pesaehitusmaterjalid. On hästi teada, et ebasobiv kohtlemine või stress tiinuse ajal võib teha kahju, sealhulgas põhjustada loote surma enne poegimist või loote ja vastsündinud poegade arengu häireid. Selleks, et ära hoida loote surma kemikaali manustamisega mitte seotud tegurite mõjul, tuleb loomi tiinuse ajal kohelda hoolikalt ja vältida välistest teguritest, näiteks müra, tingitud stressi.

Loomade ettevalmistamine

10. Tuleks kasutada terveid loomi, kes on aklimatiseerunud laboratooriumi tingimustega ning keda ei ole varem katses kasutatud, välja arvatud juhul, kui uuring toimub muu uuringu raames (vt punkt 3). Katseloomad tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Igale loomale tuleb määrata ja märkida kordumatu identifitseerimisnumber. Kõikide katserühmade loomad peaksid olema võimalikult ühesuguse kaalu ja vanusega, ning need peaksid olema kasutatava liigi ja liini tavapärasel vahemikus. Iga doosimäära juures tuleks kasutada noori täiskasvanud poegimata emasloomi. Odesid ja vendi ei tohiks lasta omavahel paarituda ja tuleb hoolitseda, et seda ei juhtuks. Tiinuse 0-päevaks (tiinestumispäevaks, *gestation day*, GD) loetakse päev, millal märgati spermat tupes ja/või vaginaalkorki. Kui tarnijalt ostetakse teadaoleva tiinestumispäevaga tiined loomad, nähakse ette sobiv kohanemisaeg (nt 2–3 päeva). Paaritatud emasloomad jagatakse erapooletul viisil ja võimalikult ühtlaselt kontrollrühmadesse ja katserühmadesse (nt soovitatavalt stratifitseeritud juhusliku meetodiga, et tagada rühmade vahel loomade ühtlane jaotus, näiteks kehamassi järgi). Sama isaslooma poolt viljastatud emasloomad tuleks jaotada võrdselt eri rühmade vahel.

KATSE KORRALDUS

Loomade arv ja sugu

11. Tiinete emasloomade arv igas kontrollrühmas ja katserühmas, mille liikmed puutuvad kokku uuritava kemikaaliga, peaks olema piisav, et sünniks piisav arv järglasi neurotoksilisuse hindamiseks. Iga doosimäära puhul soovitatakse kasutada kokku 20 pesakonda. Kui iga sellise rühma kohta saavutatakse nõutav pesakondade arv, on lubatud paralleelsed ja vahelduvad rühmadega manustamiskavad; paralleelproovide arvessevõtmiseks kasutatakse sobivaid statistilisi mudeleid.
12. Hiljemalt 4. sünnijärgsel päeval (*post-natal day*, PND 4) (sünni päev on PND 0) tuleks kõikide pesakondade suurus ühtlustada; selleks surmatakse juhusliku valiku alusel liigsed pojad, et kõikide pesakondade suurus oleks võrdne (23). Pesakonna suurus ei tohiks ületada keskmist pesakonna suurst kasutatava näriliste liini puhul (8–12). Pesakonda tuleks alles jätta võrdne arv isas- ja emasloomi, kui võrd see on võimalik. Poegade selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi põhjal, ei ole sobiv. Pärast pesakondade standardimist (liigsete poegade surmamist) ja enne edasiste funktsionaalsete näitajate määramist tuleks kõik võõrutuseelsete või võõrutusjärgsete katsete jaoks ettenähtud pesakonna liikmed varustada individuaalse kordumatu märgisega, kasutades sobivat humaanset meetodit (nt 24).

Loomade jagamine rühmadesse funktsionaalsete ja käitumuslike testide tegemiseks, aju massi määramiseks ja neuropatoloogiliseks hindamiseks

13. Meetodis lubatakse kasutada eri lähenemisviise selleks, et jagada loomad rühmadesse, kes puutuvad kemikaaliga kokku *in utero* ja imetamise kaudu ning kellele tehakse funktsionaalsed ja käitumuslikud testid, kellel jälgitakse suguküpsuse saabumist ja määratakse aju massi ning keda hinnatakse neuropatoloogia seisukohast (25). Vajaduse korral võib üksikjuhtudel määrata muid käitumuslikke neuroloogilisi funktsioone (nt sotsiaalset käitumist), uurida neurokeemilisi või neuropatoloogilisi aspekte, kui sellega ei kahjustata algselt nõutud testide usaldusväärsust.
14. Pojad valitakse igast doosirühmast ja iga näitaja hindamiseks alates 4. sünnijärgsest päevast (PND 4). Poegade valimine rühmadesse peaks toimuma nii, et iga doosirühma iga pesakonna kummastki soost pojad oleksid võimalikult ühtlaselt esindatud kõikides testides. Motoorse aktiivsuse katsetes tuleks poegade hulgast ühtesid ja samu isas- ja emasloomapaare uurida igas võõrutuseelses vanuses (vt punkt 35). Kõikide muude käitumuslike testide tegemiseks võib määrata sama või erineva isaslooma ja emaslooma paari. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud loomade kognitiivse talitluse hindamisel võib osutuda vajalikuks määrata rühmadesse erinevad pojad, et vältida tulemuste sõltumist erineva vanuse või eelneva õppimise mõjust (26, 27). Võõrutamise ajal (PND 21) võib pojad, keda katsete tegemiseks ei valita, humaansel viisil surmata. Kõik muudatused poegade rühmadesse jagamisel tuleks katseprotokollis fikseerida. Statistiline mõõtmisühik peaks olema pesakond (või poeginud emasloom), aga mitte poeg.
15. Poegade jagamiseks rühmadesse, millega tehakse võõrutuseelseid ja -järgseid vaatlusi, kognitiivseid katseid, patoloogivaatlusi jne, on mitmeid võimalusi (vt üldkava (joonis 1) ja rühmadesse jagamise näide (1. liide)). Soovitav minimaalne loomade arv igas doosirühmas võõrutuseelsete ja -järgsete uuringute puhul on järgmine:

Kliinilised vaatlused ja kehamass	Kõik loomad
Üksikasjalikud kliinilised vaatlused	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Aju mass (pärast fikseerimist) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Aju mass (fikseerimata) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine immersiooni või perfusiooniga) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine perfusiooniga) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)

Suguküpsuse saabumine	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Muud olulised arengunäitajad (soovi korral)	Kõik loomad
Käitumise ontogenees	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Motoorne aktiivsus	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Motoorne ja sensoorne funktsioon	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Õppimine ja mälu	10/sugu ^(a) (1/pesakond)

(^a) Kognitiivse talitluse katsed: tundlikkusest olenevalt tuleb kaaluda suurema arvu loomade kasutamist, nt kuni 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast (loomade rühmadeks jagamine, vt 1. liide) (täiendavad juhised valimi suuruse kohta on esitatud OECD juhenddokumendis 43 (8)).

Dooside manustamine

16. Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja näha ette paralleelsed kontrollrühmad. Doosimäärad tuleks määrata nii, et tekkivad toksilised mõjud tugevneksid järk-järgult. Kui seda ei piira kemikaali füüsikalise-keemilised või bioloogilised omadused, tuleks kõrgeim doosimäär valida nii, et tiinel emasloomal ilmneksid mürgistusnähud (nt kliinilised sümptomid, kehamassi väiksem (mitte üle 10 %) suurenemine ja/või tõendid mürgisuse kohta sihtorganile, mis ei luba doosi piirmäära suurendada). Suurima doosi piiriks võib teatavate eranditega olla 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Näiteks võib inimese oodatava kokkupuute ulatus sundida kasutama suuremat doosi. Teise võimalusena tuleks teha prooviuuring või esialgsed doosivahemiku määramise katsed, et leida suurim doos, mis põhjustaks tiinel emasloomal vaid minimaalseid mürgistusnähtusid. Kui standardse arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringu või prooviuuringuga on näidatud, et uuritav kemikaal põhjustab arenguhäireid, peaks kõrgeim doosimäär olema selline, mis ei oleks järglaste jaoks väga mürgine, näiteks ei põhjusta järglaste surma juba emaüas või kohe pärast sündi, samuti ei põhjusta selliseid väärarenguid, mis ei võimalda mõistlikult hinnata arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust. Väikseim doos tuleks valida nii, et see ei põhjustaks mingeid toksilisuse sümptomeid ei tiinel emasloomal ega järglastel, samuti mitte neurotoksilisuse sümptomeid. Doosimäärade alanev järjestus tuleks valida nii, et saaks näidata toime sõltuvust doosist ja leida täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldava doosi (*No-Observed-Adverse Effect Level*, NOAEL) või jälgitava toime piiri lähedase doosi, mis lubaks määrata võrdlusdoosi. Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate doosimäärade kehtestamisel ja neljanda doosirühma lisamine on sageli eelistatav väga suurte doosidevaheliste vahemike (nt üle kümne korra) puhul.
17. Doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad andmed mürgisuse kohta ning ka lisateavet uuritava kemikaali või samalaadse aine metabolismi ja toksiko-kineetika kohta. Kõnealune teave aitab ehk ka näidata, et dooside manustamise režiim on valitud õigesti. Dooside otsest manustamist vastsündinud poegadele tuleks kaaluda kokkupuudet ja farmakokineetikat käsitleva teabe põhjal (28, 29). Enne dooside otsese manustamise uuringu tegemist tuleks hoolikalt kaaluda eeliseid ja puudusi (30).
18. Paralleelseks kontrollrühmaks peaks olema kahjutut ainet saav kontrollrühm või kandeainet saav kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kõigile loomadele tuleks kehamassist lähtudes manustada ühesugune kogus kas uuritavat kemikaali või kandeainet. Kui dooside manustamise hõlbustamiseks kasutatakse kandeainet või muud lisaainet, tuleks pöörata tähelepanu järgmistele aspektidele: kandeaine mõju uuritava kemikaali imendumisele, jaotumisele kehas, metabolismile või peetumisele; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võib muuta selle toksilisi omadusi, ning mõju loomade sööda- või veetarbimisele või toitumusele. Kandeainel ei tohiks olla mõju, mis võiks häirida uuringu tulemuste tõlgendamist; samuti ei tohiks kandeaine neurotoksilisuse tõttu põhjustada käitumishäireid, mõjutada paljunemist või embrüo arengut. Uudse kandeaine puhul tuleks lisaks kandeaine kontrollrühmale kasutada veel võltskontrollrühma. Kontrollrühma(de) loomi tuleks kohelda nii nagu katserühma loomi.

Dooside manustamine

19. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks manustada viisil, mis on kõige asjakohasem inimese kokkupuute puhul, võttes arvesse metabolismiga ja katselooma kehas jaotumisega seotud teavet. Manustamisviisi on tavaliselt suukaudne (näiteks sündsöötmise sondiga või sööda või joogivee kaudu), kuid kasutada võib ka muid manustamisviise (nt naha kaudu, sissehingamise teel), sõltuvalt kemikaali omadustest ning eeldatavast või teadaolevast kokkupuuteteest inimese puhul (täiendavad juhised on esitatud juhenddokumendis 43 (8)). Valitud manustamisviisi tuleks põhjendada. Uuritavat kemikaali tuleks manustada igal päeval ligikaudu samal ajal.
20. Iga looma doos peaks tavaliselt põhinema looma kõige viimasel individuaalselt kindlaksmääratud kehamassil. Tiinuse viimasel kolmandikul tuleks doosi määramisega olla siiski ettevaatlik. Kui emasloomadel, kellele manustati kemikaali, avalduvad liigse mürgistuse sümptomid, tuleks need loomad humaanselt tappa.
21. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks paaritatud emasloomadele manustada vähemalt kord päevas alates loodete implantatsioonist (GD 6) kogu imetamise aja jooksul (kuni PND 21), nii et pojad puutuksid kemikaaliga kokku närvisüsteemi sünnieelse ja -järgse arengu jooksul. Nii dooside manustamise algust kui ka kestust ja sagedust võib muuta, kui tõendid osutavad, et katse teistsugune korraldus võiks inimese kokkupuudet arvestades olla asjakohasem. Muu liigi puhul tuleks dooside manustamise kestust kohandada, et tagada kokkupuude kemikaaligaaju arengu kõikidel varastel järkudel (s.o järkudel, mis vastavad inimaju sünnieelsele ja varasele sünnijärgsele kasvule). Dooside manustamine võib alata kohe tiinuse algusest (GD 0), kuigi tuleks silmas pidada võimalust, et kemikaal võib põhjustada embrüo hukkumise juba enne implantatsiooni. Manustamise alustamisega GD 6-st saaks seda riski vältida, kuid arengujärgud GD 0 — GD 6 jäävad siis kemikaaliga mõjutamata. Kui labor ostab teadaoleva tiinestumispäevaga tiineid loomi, on raske alustada dooside manustamist GD 0-st ja seega oleks hea päev alustamiseks GD 6. Katselabor peaks kehtestama dooside manustamise korra vastavalt uuritava kemikaali mõju käsitlevale asjakohasele teabele, varasematele kogemustele ja logistilistele kaalutlustele; see võib hõlmata dooside manustamist ka pärast võõrutamist. Doosi ei manustata poegimise päeval sellistele loomadele, kes ei ole veel kõiki järglasi sünnitanud. Üldiselt eeldatakse, et järglaste kokkupuude kemikaaliga toimub emapiima kaudu; kuid kui järglaste jätkuva kokkupuute kohta puuduvad tõendid, tuleks kaaluda kemikaali manustamist otse poegadele. Tõendeid järglaste katkematu kokkupuute kohta võib leida näiteks farmakokineetilisest teabest, teabest mürgisuse kohta järglastele või biomarkerite muutustest (28).

VAATLUSED**Emasloomade jälgimine**

22. Kõiki emasloomi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et hinnata nende tervises seisundit, sealhulgas haigestumust ja suremust.
23. Dooside manustamise ja vaatluste perioodil tuleks korrapäraselt teha üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi (vähemalt kahel korral poegimiseelisel manustamisperioodil ja kahel korral imetamisaegsel manustamisperioodil), kasutades vähemalt kümnet emaslooma iga doosimäära puhul. Loomi peaksid väljaspool kodupuuri vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada loomade stressi ja vaatlaja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatlajate arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et ühe uuringu puhul teeks vaatlusi sama spetsialist.
24. Täheldatud sümptomid tuleks registreerida. Võimaluse korral tuleks registreerida ka täheldatud sümptomite intensiivsus. Kliinilised vaatlused peaksid hõlmama vähemalt järgmist: naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine ja/või suu kaudu hingamine, kõik urineerimise või roojamisega seotud ebatavalised sümptomid).
25. Kõik kehaasendi, aktiivsuse astme (nt standardala vähenenud või suurenenud uurimine) ning liigutuste koordineerimise muutused tuleks samuti üles märkida. Muutused kõnnakus (nt taarumine, ataksia), kehaasendis (nt küürus selg) ning reageerimises kättevõtmisele, mahapanemisele või muudele keskkonna stiimulitele ning klooniliste või tooniliste liigutuste, krampide või värinate esinemine, stereotüübid (nt ülemäärane karvkatte eest hoolitsemine, ebatavalised pealigutused, korduv tiirutamine) või veider käitumine (nt hammustamine või enda ülemäärane lakkumine, enesevigastamine, tagurpidi kõndimine, häälitsemine) või agressiivsus tuleks registreerida.

26. Toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.
27. Dooside manustamise ajal tuleks loomi kogu uuringu kestel kaaluda vähemalt üks kord nädalas, sünnituse päeval või selle läheduses ja päeval PND 21 (võõrutamine). Emasloomade sundsöötmise uuringute puhul tuleks loomi kaaluda vähemalt kaks korda nädalas. Doose tuleks sobivaks kohandada vastavalt igale kehamassi määramise tulemusele. Sööda tarbimist tuleks tiinuse ja imetamise ajal mõõta vähemalt iga nädal. Kui kemikaali manustatakse joogivee kaudu, tuleks vee tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas.

Järglaste jälgimine

28. Kõiki järglasi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et teha kindlaks mürgistusnähud, haigestumus ja suremus.
29. Dooside manustamise ja vaatluste ajal tuleks teha järglaste üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi. Järglasi (vähemalt üks loom kummastki soost ja igast pesakonnast) peaksid vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada vaatleja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatluste arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et vaatlusi teeks sama spetsialist. Iga vaadeldava arengujärgu kohta tuleks jälgida vähemalt punktides 24 ja 25 kirjeldatud näitajaid.
30. Kõik järglaskonnas ilmnevad toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.

Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad

31. Võõrutuseelse arengu näitajate (kõrvalesta tipu eemaldumine peast, silmade avanemine, lõikehammaste ilmumine) muutused korreleeruvad hästi kehamassiga (30, 31). Kehamass võib olla parim füüsilise arengu taseme näitaja. Arengu põhinäitajate mõõtmist soovitatakse seepärast ainult siis, kui on olemas varasemad tõendid selle kohta, et kõnealused näitajad annavad täiendavat teavet. Kõnealuste näitajate hindamise ajakava on esitatud tabelis 1. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.
32. Füüsilise arengu hindamise korral on soovitatav kasutada paaritusjärgset, mitte sünnijärgset vanust (33). Kui poegade teha katseid võõrutamise päeval, on soovitatav teha katsed enne võõrutushetke, et vältida võõrutamisega seotud stressi segavat mõju. Katseid ei tuleks teha ka kahel võõrutamisjärgsel päeval.

Tabel 1

Füüsiliste ja arengut iseloomustavate näitajate ning funktsionaalsete või käitumuslike näitajate hindamise ajakava ^(a)

Näitajad	Vanusejärgud	Võõrutuseelne ^(b)	Noorukiiga ^(b)	Noored täiskasvanud ^(b)
Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad				
Kehamass ja kliinilised vaatlused		iga nädal ^(c)	vähemalt iga kahe nädala tagant	vähemalt iga kahe nädala tagant
Aju mass		PND 22 ^(d)		katse lõpetamisel
Neuropatoloogia		PND 22 ^(d)		katse lõpetamisel
Suguküpsuse saabumine		—	vajaduse korral	—
Muud arengunäitajad ^(e)		vajaduse korral	—	—

Näitajad	Vanusejärgud	Võõrutuseelne ^(b)	Noorukiiga ^(b)	Noored täiskasvanud ^(b)
----------	--------------	------------------------------	---------------------------	------------------------------------

Funktsionaalsed või käitumuslikud näitajad

Käitumise ontogenees	vähemalt kaks mõõtmist		
Motoorne aktiivsus (sh harjumine)	1–3 korda ^(f)	—	üks kord
Motoorne ja sensoorne funktsioon	—	üks kord	üks kord
Õppimine ja mälu	—	üks kord	üks kord

^(a) Selles tabelis on esitatud minimaalne mõõtmiskordade arv. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu (näiteks vanad loomad) või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.

^(b) Poegade ei soovitata teha katseid kahel võõrutusjärgsel päeval (vt punkt 32). Soovitatav vanus noorloomadega katsete tegemiseks on järgmine: õppimine ja mälu — PND 25 ± 2; motoorne ja sensoorne funktsioon — PND 25 ± 2. Soovitatav vanus katsete tegemiseks noorte täiskasvanutega on PND 60–70.

^(c) Poegadele dooside otse manustamise korral tuleks kehamassi mõõta vähemalt kaks korda nädalas, et kohandada doose vastavalt kehamassi kiirele suurenemisele.

^(d) Aju massi ja neuropatoloogiat võib hinnata varasemal ajal (nt PND 11), kui see on sobiv (vt punkt 39).

^(e) Muid arengu näitajaid lisaks kehamassile (nt silmade avanemine) tuleb registreerida sündmuse toimumise ajal (vt punkt 31).

^(f) Vt punkt 35.

33. Elusad järglased tuleb üle lugeda ja määrata nende sugu, nt visuaalse vaatluse või anogenitaalse vahemaa määramisega (34, 35), ning iga poega pesakonnas tuleks kaaluda kohe pärast sündi või varsti selle järel, vähemalt kaks korda nädalas imetamise ajal ja vähemalt iga kahe nädala tagant pärast seda. Suguküpsuse saabumise määramiseks tuleks igas pesakonnas vähemalt ühel isasloomal ja ühel emasloomal määrata vanus ja kehamass, kui neil toimub tupe avanemine (36) või eesnaha eraldumine (37).

Käitumise ontogenees

34. Valitud käitumisviisinäitajate arengut tuleks mõõta sobivas vanuses vähemalt ühel pojalt kummastki soost igas pesakonnas, kusjuures kõigil katsepäevadel kasutatakse kõikide käitumisviisinäitajate määramiseks samu loomi. Mõõtmispäevad jaotatakse ühtlaselt üle vaatluste aja, et määrata normaalsete käitumisjoonte areng või nende muutused, mis on seotud dooside manustamisega (38). Hinnata võiks näiteks järgmiste käitumisjoonte kujunemist: õige kehaasendi taastamise refleksi, negatiivne geotaksis ja motoorne aktiivsus (38, 39, 40).

Motoorne aktiivsus

35. Motorset aktiivsust tuleks jälgida (41, 42, 43, 44, 45) võõrutuseelses vanuses ja täiskasvanuvanas. Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Katsete periood peab olema piisavalt pikk, et näidata kemikaaliga töötlemata kontrollrühmas katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist. Käitumise ontogeneesi hindamiseks on väga soovitatav kasutada motoorse aktiivsuse hindamist. Kui seda kasutatakse käitumise ontogeneesi hindamiseks, tuleks kõikides võõrutuseelsetes katsetes kasutada samu loomi. Katseid tuleks teha piisava sagedusega, et demonstreerida katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist (44). Selleks võib kuluda kolm sessiooni enne võõrutamist ja võõrutamise päeval (nt päevad PND 13, 17, 21). Samu ühe pesakonna loomi tuleks vaadelda ka täiskasvanueas enne katse lõpetamist (nt päevad PND 60–70). Katseid võib vajaduse korral teha ka lisapäevadel. Motorset aktiivsust tuleks mõõta salvestusseadmega automatiseeritud aparadi abil, millega saab määrata nii tegevuse hoogustumist kui ka vähenemist (nt baastegevus, mida seadmega saab mõõta, ei tohiks olla nii vähenemine, et selle vähenemist ei õnnestu registreerida, ega nii hoogne, et selle edasist hoogustumist ei saa registreerida). Iga seadet tuleb kontrollida standardmeetodiga, et tagada võimalikkuse piires eri seadmete mõõtmiste ja eri päevadel toimuvate mõõtmiste usaldusväärsus. Doosirühmade loomad jaotatakse eri seadmete vahel võimalikult tasakaalustatult. Iga loomaga tuleks

katseid teha eraldi. Doosirühmade katsed peavad toimuma tasakaalustatult eri aegadel, et tulemusi ei mõjutaks tegevuse ööpäevased rütmid. Tuleks püüda tagada, et katsetingimuste varieeruvus oleks võimalikult väike ja et ei esineks süstemaatilist viga. Paljude käitumisnäitajate mõõtmist mõjutavad sellised muutujad nagu müratase, katsepuuri kuju ja suurus, temperatuur, suhteline õhuniiskus, valgustustingimused, lõhnad, kodupuuri või uue katsepuuri kasutamine ja tähelepanu häirivad keskkonnatingimused.

Motoorne ja sensoorne funktsioon

36. Motoorset ja sensoorset funktsiooni tuleks üksikasjalikult uurida vähemalt üks kord noorukieas ja üks kord noore täiskasvanu eas (nt PND 60–70). Katsete tegemise kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Tuleb teha piisavalt katseid, et koguda vajalikud kvantitatiivsed andmed sensoorsete funktsioonide kohta (nt somatosensoorsed ja vestibulaarfunktsioonid) ja motoorsete funktsioonide kohta (nt jõud, koordineatsioon). Mõned motoorsete ja sensoorsete funktsioonide näited on tõukerefleks (tallarefleks) (46), õige kehaasendi taastamise refleksi (47, 48), ehmatava helisignaali harjumine (40, 49, 50, 51, 52, 53, 54) ja esilekutsutud võimed (55).

Õppimise ja mälu katsed

37. Assotsiatiivse õppimise ja mälu katse tuleks teha pärast võõrutamist (nt päeval 25 ± 2) ja noorte täiskasvanutega (PND 60 ja vanemad). Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Nende kahe arengutaseme puhul võib kasutada sama või eraldi katset. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud rottide õppimise ja mälu katse(te) valimisel lubatakse teatavat paindlikkust. Katse(d) tuleks siiski kavandada selliselt, et oleksid täidetud kaks kriteeriumi. Esiteks, õppimist tuleks hinnata mitme korduva õppimiskatse või -sessiooni jooksul ilmnevate muutuste kaudu või ühtainukest ülesannet hõlmava katsega ja võrrelda seda kontrollkatsega, milles kontrollitakse õpetamiskatse võimalikke mitte-assotsiatiivseid mõjusid. Teiseks peaksid katsed hõlmama mingil määral (lühiajalise või pikaajalise) mälu kasutamist, lisaks algsele äraõppimisele (omandamine), kuid seda mälu näitajat ei saa registreerida, kui sama katsega ei ole mõõdetud omandamise näitajat. Kui õppimise ja mälu katsetest ilmneb kemikaali mõju, tuleb kaaluda lisakatsete korraldamist, et jätta kõrvale alternatiivsed tõlgendused, mille aluseks on sensoorsed või motivatsioonilised muutused ja/või motoorse suutlikkuse muutumine. Lisaks eespool nimetatud kahele kriteeriumile on soovitatav, et õppimise ja mälu katse tuleks valida nii, et katse oleks tõendatult tundlik uuritava kemikaali suhtes, kui kirjandusest on kättesaadav kõnealune teave. Kui sellist teavet ei ole, võiksid selliste katsete näideteks, mida võib teha eespool kirjeldatud kriteeriumide täitmiseks, olla passiivne vältimine (43, 56, 57), viivitusega reageerimine asendile täiskasvanud roti (58) või rotipoja (59) puhul, haistmise kaudu mõjutamine (43, 60), Morrisi veelabürindi katse (61, 62, 63), Bieli või Cinninati labürindi katse (64, 65), radiaallabürindi katse (66), T-labürindi katse (43) ning ajakavast sõltuva käitumise omandamine ja säilitamine (26, 67, 68). Kirjanduses on kirjeldatud veel muid katseid võõrutatud rotipoegade (26, 27) ja täiskasvanud rottide jaoks (19, 20).

Surmamisjärgne uurimine

38. Emaloomad võib pärast järglaste võõrutamist surmata.
39. Järglaste neuropatoloogiliseks uurimiseks kasutatakse kudesid, mis on saadud loomadelt, kes on humaansest surmatud päeval PND 22 või varem (PND 11 — PND 22) või katse lõpetamisel. Päeval PND 22 surmatud järglaste puhul tuleks hinnata ajukudesid; katse lõpetamisel surmatud loomade puhul tuleks hinnata nii kesknärvisüsteemi kudesid kui ka perifeerse närvisüsteemi kudesid. Päeval PND 22 või varem surmatud loomad võib fikseerida immersiooni või perfusiooniga. Katse lõpetamisel surmatud loomad tuleks fikseerida perfusiooniga. Koenäidiste ettevalmistamisel tuleks kõikidel etappidel — loomade perfusioon, kudede väljalõikamine, kudede töötlemine ja mikroskoobipreparaatide värvimine — kasutada tasakaalustatud katsekorraldust, nii et igas partiiis oleks iga doosirühma esindav valim. Täiendavad suunised neuropatoloogia kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 20 (9), vt ka (103).

Koeproovide töötlemine

40. Kõik lahkamise ajal märgatavad suured kõrvalekalded tuleks üles märkida. Võetud koeproovid peaksid esindama kõiki peamisi närvisüsteemi piirkondi. Koeproove tuleks säilitada sobivas fiksaatoris ja neid tuleks töödelda vastavalt avaldatud standardsetele histoloogijuhenditele (69, 70, 71, 103). Parafiinis konserveerimine on sobiv kesk- ja perifeerse närvisüsteemi kudede puhul, kuid osmiumi kasutamine järelfikseerimiseks koos epoksükonserveerimisega võib olla sobiv, kui on vaja saavutada parem lahutusvõime (nt perifeersete närvide puhul, kui kahtlustatakse perifeerset neuropaatiat ja/või perifeersete närvide morfoomeetriliseks analüüsiks). Morfoomeetriliseks analüüsiks

kogutav ajukude tuleks kõikide doosirühmade puhul paigutada sobivasse säilituskeskkonda samal ajal, et vältida kokkutõmbumisest tingitud artefakte, mis võivad kaasneda pikaajalise säilitamisega fiksaatoris (6).

Neuropatoloogiline uuring

41. Kvalitatiivse uuringu eesmärgid on järgmised:

- i) teha kindlaks närvisüsteemi piirkonnad, milles esineb nähtavaid neuropatoloogilisi muutusi;
- ii) teha kindlaks, millist tüüpi neuropatoloogilised muutused tulenevad kokkupuutest uuritava kemikaaliga, ning
- iii) määrata neuropatoloogiliste muutuste ulatus raskusastme järgi.

Koeproovidest saadud representatiivseid histoloogilisi lõikeid peaks mikroskoobiga uurima nõuetekohaselt koolitatud patoloog, et leida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta. Igale neuropatoloogilisele muutusele tuleks subjektiivse hindamisskaala alusel omistada raskusaste. Värvimine hematoksüliini ja eosiiniga võib olla piisav, et hinnata päeval PND 22 või varem humaanselt surmatud loomade aju lõikeid. Katse lõpetamisel surmatud loomade kesknärvisüsteemi ja perifeerse närvisüsteemi lõigete uurimiseks soovitatakse kasutada aga müeliinivärve (nt *Luxol fast blue*/kresüülviolett) ja hõbedapõhiseid värve (nt Bielschowsky või Bodiani värv). Vastavalt patoloogi eksperthinnangule ja võttes arvesse täheldatud muutusi, võib kasutada muid sobivaid värve, et teha kindlaks ja iseloomustada teatavat tüüpi muutusi (nt gliiafibrillide happelise proteiini (GFAP) või lektiini histokeemia, et hinnata gliia ja mikroglia muutusi (72), fluorojadeit-värv nekroosi tuvastamiseks (73, 74) või närvide degeneratsiooni suhtes spetsiifiline hõbedapõhine värv (75)).

42. Tuleks teha morfomeetiline (kvantitatiivne) hindamine, kuna need andmed võivad aidata tuvastada kokkupuutega seotud mõju ja on väärtuslikud kemikaaliga kokkupuutest tingitud ajumassi või aju morfoloogia erinevuste tõlgendamisel (76, 77). Närvikoest tuleks võtta proovid ja valmistada need ette morfomeetriliseks hindamiseks. Morfomeetiline hindamine võib hõlmata näiteks aju teatavate piirkondade joonmõõtmete või pindala määramist (78). Joonmõõtmete või pindala määramiseks on vaja kasutada homoloogseid lõikeid, mis on hoolikalt valitud usaldusväärsete mikroskoopiliste punktide järgi (6). Et tuvastada kemikaaliga kokkupuute mõju sellistele näitajatele nagu teatava neuroanatomilise piirkonna maht või rakkude arv, võib kasutada stereoloogiat (79, 80, 81, 82, 83, 84).
43. Ajus tuleks otsida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta, mis on seotud dooside manustamisega, ja piisavad näidised tuleks võtta kõikidest peamistest aju piirkondadest (nt haistmissibulad, ajukoor, hipokamp, basaalganglionid, talamus, hüpotalamus, keskaju (*tectum*, *tegmentum* ja ajuvarred), ajusild, piklikaju, väikeaju), et läbivaatamine oleks põhjalik. On oluline, et kõigilt loomadelt võetaks lõiked samas tasapinnas. Katse lõpetamisel humaanselt surmatud täiskasvanud loomadelt tuleks võtta seljaaju ja perifeerse närvisüsteemi representatiivsed lõiked. Uuritavad alad peaksid hõlmama silma koos nägemisnärvi ja võrkkestaga, seljaaju kaela- ja nimmetüve kohal, selgmisi ja kõhtmisi närvijuuri, proksimaalset istmikunärvi, proksimaalset säärenärvi (põlve juures) ja säärenärvi sääremarjalihase harusid. Seljaajust ja perifeersest närvist tuleks teha nii rist- kui ka pikilõiked.
44. Neuropatoloogilisel hindamisel tuleks otsida närvisüsteemi arenguhäirete tunnuseid (6, 85, 86, 87, 88, 89), lisaks rakulistele muutustele (nt närvirakkude vakuolisatsioon, degeneratsioon, nekroos) ja koemuutustele (nt gliosis, leukotsüütide infiltratsioon, tsüstide moodustumine). Sellega seoses on oluline, et dooside manustamisega seotud muutusi tuleb eristada tavalistest arenguga seotud muutustest, mis peaksid toimuma looma surmamise ajaks (90). Arengu häirumisele viitavad muu hulgas näiteks järgmised leiud:

- haistmissibulate, aju või väikeaju üldsuuruse või kuju muutused;
- aju eri piirkondade suhtelise suuruse muutused, sealhulgas sellised aju piirkondade suuruse muutused, mis on tingitud tavaliselt ajutiste rakupopulatsioonide või aksonite väljakasvude kaotsiminekest või püsijäämisest (nt väikeaju väline germinaalkiht, mõhnkeha);
- muutused rakkude paljunemises, migreerumises ja diferentseerimises, millele osutab ülemäärane apoptoos või nekroos, väärasetsusega, valesuunaliste või vääralt moodustunud närvirakkude kogumid või hajutatud populatsioonid või muutused ajukoorestruktuuride kihtide suhtelises suuruses;

- muutused müeliniseerumises, sealhulgas müeliiniga kaetud struktuuride muutunud üldsuurus või värvumine;
- vesipea tunnused, eelkõige vatsakeste suurenemine, ajuveejuha ahenemine ja ajupoolkerade õhenemine.

Neuropatoloogiliste muutuste doosi ja toime vahelise sõltuvuse analüüsimine

45. Kvalitatiivse ja kvantitatiivse neuropatoloogilise analüüsi puhul soovitatakse toimida järgmiselt. Esiteks võrreldakse suure doosi rühma loomade lõikeid kontrollrühma loomade lõigetega. Kui suure doosi rühma loomadel neuropatoloogilisi muutusi ei leita, ei ole täiendav analüüs vajalik. Kui suure doosi rühmade loomadel leitakse neuropatoloogilisi muutusi, uuritakse keskmise ja madala doosi rühmade loomi. Kui katse suure doosi rühmaga lõpetatakse loomade surma või muu segava mürgistuse tõttu, tuleks suure ja keskmise doosi rühma loomadel uurida neuropatoloogilisi muutusi. Kui väiksema doosi rühma loomadel esineb tunnuseid, mis viitavad kemikaali neurotoksilisusele, tuleks neuropatoloogiline analüüs teha osutatud rühmade loomadega. Kui kvalitatiivse või kvantitatiivse vaatlusega leitakse dooside manustamisega seotud neuropatoloogilisi muutusi, tuleks määrata kõikide kahjustuste või morfoomeetriliste muutuste esinemise, sageduse ja raskusastme sõltuvus doosist, kasutades kõikide doosirühmade loomade vaatluse andmeid. Hindamine peaks hõlmama kõiki ajupiirkondi, milles on leitud neuropatoloogilisi muutusi. Iga kahjustuste tüübi puhul tuleks kirjeldada näitajaid, mille alusel määrati raskusaste, sealhulgas omadused, mida kasutati raskusastmete eristamiseks. Iga tüüpi kahjustuste ja nende raskusastmete esinemissagedus tuleks registreerida ja teha statistiline analüüs, et hinnata doosi ja toime vahelise sõltuvuse laadi. Soovitatakse kasutada koodmärgisega varustatud mikroskoobipreparaate (91).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

46. Andmed tuleks esitada iga looma kohta ja samuti kokkuvõtliku tabelina, milles iga katserühma kohta näidatakse muutuste tüübid ning iga tüübi puhul emasloomade, järglaste (eraldi kummastki soost) ja pesakondade arv, kellel see esines. Kui järglased viiakse pärast sündi otse kokkupuutesse kemikaaliga, tuleb teatada kokkupuuteviisi, kestus ja kokkupuute ajavahemik.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

47. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuring annab teavet selle kohta, millist mõju avaldab korduv sünnieelne ja varane sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga. Kuna rõhk on pandud nii üldise mürgisuse kui ka arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse näitajate määramisele, võimaldavad katsetulemused teha vahet järglaste arengu häireid põhjustaval neurotoksilisusel, kui üldist mürgistust emaloomal veel ei täheldata, ja sellisel arenguhäireid põhjustaval neurotoksilisusel, mis avaldub ainult kontsentratsioonil, mis on mürgine ka emaloomale. Kuna seosed katse kavandamise, andmete statistilise analüüsi ja bioloogilise olulisuse vahel on keerulised, kasutatakse arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu andmete õigeks tõlgendamiseks eksperdi hinnanguid (107, 109). Katsetulemuste tõlgendamisel kasutatakse tõendite kaalukusel põhinevat lähenemisviisi (20, 92, 93, 94). Arutades tuleks käitumuslike ja morfoloogiliste leidude tüüpe ning doosi ja toime vahelist sõltuvust. Sellise iseloomustuse koostamisel tuleks kasutada kõiki andmeid arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse kohta, sealhulgas inimeste epidemioloogilisi uuringuid või juhtumiaruandeid ja katseloomade uuringuid (nt toksiko-kineetilised andmed, struktuuri-aktiivsuse sõltuvused, muude toksikoloogiuuringute andmed). See hõlmab seost uuritava kemikaali doosi ja neurotoksilise mõju olemasolu või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel kummagi soo puhul (20, 95).
48. Andmete hindamisel tuleks arutada nii bioloogilist kui ka statistilist tähtsust. Statistilist analüüsi tuleks vaadelda kui vahendit, mis suunab andmete tõlgendamist, kuid ei määra seda. Statistilise olulisuse puudumine ei tohiks olla ainus põhjendus järeldamiseks, et kokkupuude kemikaaliga ei avalda mõju, ja statistiline olulisus ei saa olla ainus põhjendus, millest järeldatakse, et kemikaal avaldab mõju. Et hoiduda võimaliku valenegatiivse järelduse tegemisest ja kuna „mõju puudumise” tõendamine on juba põhimõtteliselt raske, tuleks arutada kõiki olemasolevaid andmeid mõju olemasolu kohta ja varasema kontrolli andmeid, eriti kui katse näitas, et dooside manustamine mõju ei avalda (102, 106). Valepositiivse järelduse tõenäosust tuleks arutada kõikide andmete statistilise hindamise põhjal (96). Hindamisel tuleks vaadelda neuropatoloogiliste ja käitumuslike muutuste vahelist seost, kui täheldati mingeid muutusi.

49. Kõigi andmete analüüsimisel tuleb kasutada statistilisi mudeleid, milles arvestatakse katse korraldust (108). Parameetrilise või mitteparameetrilise analüüsi valimine peaks olema põhjendatud, võttes arvesse selliseid tegureid nagu andmete laad (otsesed või teisendatud andmed) ja nende jaotust, samuti valitud statistilise analüüsi meetodi suhtelist stabiilsust. Lähtudes uuringu eesmärgist ja katse kavast, tuleks statistilise analüüsi meetod valida nii, et viia miinimumini I tüüpi (valepositiivse) vea ja II tüüpi (valenegatiivse) vea võimalikkus (96, 97, 104, 105). Kui arengu-uuringus kasutatakse loomaliiki, kelle pesakonnas on mitu poega, kellega tehakse katseid, tuleks statistilises mudelis vaadelda pesakonda, et vältida I tüüpi vea võimaluse olulist suurenemist (98, 99, 100, 101). Statistiline mõõtmisühik peaks sel juhul olema pesakond ja mitte poeg. Katsed peaksid olema kavandatud nii, et ühe pesakonna liikmeid ei käsitataks sõltumatute vaatlusaluste loomadena. Kui ühe ja sama vaatlusobjekti põhjal määratakse mitut näitajat, tuleks nende näitajate analüüsiks kasutada statistilisi mudeleid, milles võetakse arvesse, et mõõtmised ei ole sõltumatud.

Katseprotokoll

50. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- füüsiline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- identifitseerimisandmed, sh päritolu;
- preparaadi puhtus ja teadaolevad või eeldatavad lisandid.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valiku põhjendamine, kui kandeaineks ei ole vesi või füsioloogiline soolalahus.

Katseloomad:

- kasutatud loomaliik ja liin, ning põhjendus, kui see on muu kui rott;
- katseloomade tarnija;
- loomade arv, vanus katse alguses ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, sööt, vesi jne;
- iga looma mass katse alguses.

Katsetingimused:

- doositaseme valimise põhjendus;
- dooside manustamise tee ja ajavahemiku põhjendus;
- manustatavate dooside üksikasjad, sh kandeaine, mahu ja manustatava aine füüsilise vormi üksikasjad;
- üksikasjad uuritava kemikaali koostise/söödavalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;
- meetod, mida kasutati emaloomade ja järglaste kordumatuks märgistamiseks;
- üksikasjalik randomiseerimismeetodi(te) kirjeldus: kuidas juhuslikkuse alusel jaotati emaloomad doosirühmadesse, valiti välja järglased surmamiseks ja määrati järglased katserühmadesse;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- vajaduse korral söödas/joogivees või sissehingatavas õhus oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendus tegelikult päevadoosiks (mg kehamassi kg kohta);
- keskkonningimused;
- üksikasjad sööda ja vee kvaliteedi kohta (nt kraanivesi, destilleeritud vesi);
- uuringu alustamise ja lõpetamise kuupäevad.

Vaatlused ja katsemeetodid:

- üksikasjalik meetodi kirjeldus: kuidas standarditi leiud jm protseduurid, samuti märgatud leidudele hindepunktide andmise tööjuhendid;
- kõikide katses kasutatud meetodite loetelu ja nende kasutamise põhjendused;
- kõikide kasutatud käitumuslike, funktsionaalsete, patoloogia-, neurokeemia või elektrofüsioloogiametodite üksikasjad, sealhulgas teave automaatseadmete kohta;
- seadmete kaliibrimise meetodid, seadmete samaväärsuse tagamine ja doosirühmade tasakaalustatud jaotamine katsete tegemisel;
- lühike selgitus kõigi otsuste kohta, milles kasutati eksperdihinnanguid.

Tulemused (individaalsed tulemused ja nende kokkuvõte, sealhulgas võimaluse korral keskväärts ja dispersioon):

- loomade arv uuringu alguses ja uuringu lõpus;
- iga katsemeetodi puhul kasutatud loomade ja pesakondade arv;
- iga looma identifitseerimisnumber ja pesakond, millest loom on pärit;
- pesakonna suurus ja sünnijärgne keskmine mass sugude kaupa;
- kehamassi ja selle muutuse andmed, sealhulgas emaloomade ja järglaste lõplik kehamass;
- sööda tarbimise ja vajaduse korral vee tarbimise andmed (nt kui uuritavat ainet manustatakse vee kaudu);
- toksilist reaktsiooni käsitlevad andmed sugude ja doosimäärade kaupa, sh surma aeg ja põhjus, kui see on asjakohane;
- toksilisuse laad, raskusaste, kestus, avaldumise päev, kellaaeg, ja edasiste üksikasjalike kliiniliste vaatluste käik;
- arengu iga olulise näitaja (kehamass, suguküpsuse saabumine ja käitumise ontogenees) hindepunktide arv igal vaatlusel;
- kõikide käitumisega seotud, funktsionaalsete, neuropatoloogiliste, neurokeemiliste, elektrofüsioloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus sugude kaupa, sealhulgas nii suurenemised kui ka vähenemised, võrreldes kontrollrühmadega;
- lahkamise tulemused;
- aju mass;
- neuroloogiliste tunnuste põhjal pandud diagnoosid ja oletatud kahjustused, sealhulgas looduslikult esinevad haigused või haigusseisundid;
- tüüpiliste muutuste fotod;
- madala lahutusvõimega kujutised, et oleks võimalik hinnata morfomeetriaks kasutatud lõigete homoloogsust;
- andmed absorptsiooni ja metabolismi kohta, sh täiendavad andmed eraldi toksiko-kineetilisest uuringust, kui need on olemas;
- tulemuste statistiline analüüs koos andmete analüüsiks kasutatud statistiliste mudelitega ja tulemused, sõltumata sellest, kas need olid olulised või mitte;
- uuringust osavõtnute loetelu koos väljaõppe näitamisega.

Tulemuste arutelu:

- teave doosi ja selle mõju kohta, sugude ja rühmade kaupa;
- muude toksiliste mõjude (sugude ja rühmade kaupa) seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksisuse kohta tehtud järeldusega;

- toksiko-kineetilise teabe mõju järeldestele;
- mõju võrdlus muude tuntud neurotoksiliste ainete mõjuga ja mõju sarnasus;
- andmed, mis kinnitavad katsemeetodi usaldusväärsust ja tundlikkust (st positiivsed ja varasemad kontrolli andmed);
- seosed neuropatoloogilise ja funktsionaalse mõju vahel, kui on seoseid;
- NOAEL või võrdlusdoos emaloomade ja järglaste puhul, sugude ja rühmade kaupa.

Järeldused:

- tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav neurotoksiline aine, ja täheldatav kahjuliku toimetada doos.

KIRJANDUS

- 1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.
- 2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Vt: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- 3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Vt: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479>].
- 4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Miles, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79–91.
- 5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Miles, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101–111.
- 6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93–100.
- 7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.
- 8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Vt: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- 9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Vt: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- 10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173–292.
- 11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology*, 2nd Edition, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.
- 12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188–197.
- 13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 1st Edition, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

- 14) Käesoleva lisa peatükk B.34. Ühe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.
- 15) Käesoleva lisa peatükk B.35. Kahe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.
- 16) Käesoleva lisa peatükk B.43. Neurotoksisuse uuring närilistel.
- 17) Käesoleva lisa peatükk B.31. Sünnieelse arengu mürgisuse uurimus.
- 18) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).
- 19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Vt: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- 20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Vt: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supplem/ehc223.htm>].
- 21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods*, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- 22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499–509.
- 23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Toxic. Appl. Toxicol.*, 38:2–6.
- 24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110–112.
- 25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Toxic. Appl. Toxicol.*, 13:118–136.
- 26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- 27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- 28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- 29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87–94.
- 30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *Sci.*, 49: 1–4.
- 31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- 32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433–439.
- 33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449–457.
- 34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383–390.
- 35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350–365.

- 36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579–586.
- 37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298–303.
- 38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489–95.
- 39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896–920.
- 40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. Vt: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67–100.
- 41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53–66.
- 42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37–82.
- 43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117–129.
- 44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247–260.
- 45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599–609.
- 46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405–411.
- 47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661–669.
- 48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589–591.
- 49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. Vt: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287–351
- 50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107–128.
- 51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181–211.
- 52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199–211.
- 53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25–30.
- 54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437–445.
- 55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. Vt: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125–145.
- 56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321–332.

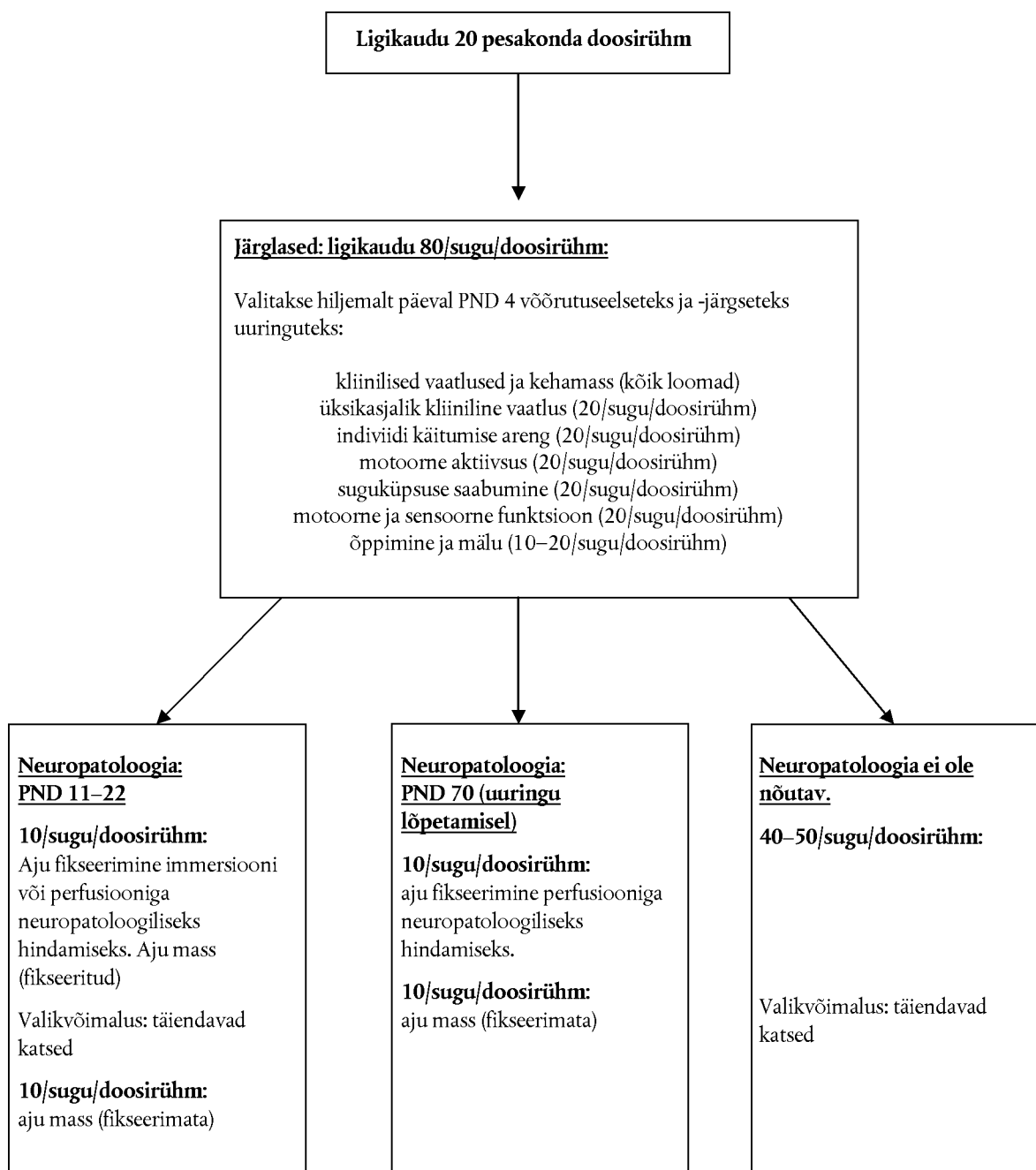
- 57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247–296.
- 58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237–244.
- 59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98–105.
- 60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465–479.
- 61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47–60.
- 62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29–69.
- 63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60–90.
- 64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235–241.
- 65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387–399.
- 66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327–332.
- 67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342–352.
- 68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338–341.
- 69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122–131.
- 70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84–107.
- 71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.
- 72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291–304.
- 73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123–130.
- 74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365–372.
- 75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545–561.
- 76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745–755.

- 77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417–432.
- 78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129–135.
- 79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- 80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305–310.
- 81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262–268.
- 82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707–710.
- 83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51–61.
- 84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813–831.
- 85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113–121.
- 86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294–298.
- 87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. Vt: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3–41.
- 88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70–74.
- 89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056–1060.
- 90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- 91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127–133.
- 92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401–405.
- 93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.
- 94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274–56322.
- 95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- 96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113–126.
- 97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21–27.

- 98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329–335.
- 99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165–172.
- 100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221–228.
- 101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587–90.
- 102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345–352.
- 103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A „best practices” approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296–313.
- 104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205–210.
- 105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295–301.
- 106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.
- 107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288–325.
- 108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.
- 109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

Joonis 1

Üldine katseskeem funktsionaalsete ja käitumuslike katsete tegemiseks, neuropatoloogia hindamiseks ja ajumassi määramiseks. Diagramm põhineb punktides 13–15 esitatud kirjeldusel (PND — päev pärast sündi). Katsete jaoks loomade määramise näited on esitatud 1. liites



1. liide

1. Allpool esitatud tabelis on kirjeldatud näiteid, kuidas võib määrata loomi katsete tegemiseks. Näidete eesmärk on selgitada, et katseloomi võib katseteks määrata mitmel viisil, olenevalt katse korralduse põhimõttest.

1. näide

2. Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, mille koosseis on 20 looma kummagi soo ja iga doosimäära kohta (edaspidi „looma/sugu/doosimäär”) (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 22. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emaslooma fikseerimata aju.
3. Võõrutusjärgsete funktsionaalsete ja käitumuslike katsete (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, helisignaaliga harjumise ja kognitiivse funktsiooni katsed noorukieas) ning suguküpsuse saabumise vanuse hindamiseks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
4. Kognitiivsete funktsioonide testimiseks noorte täiskasvanute puhul (st PND 60–70) kasutatakse ära kolmas komplekt, mille koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.
5. Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär hoitakse varuks võimalike lisakatsete jaoks.

Tabel 1

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N 10 M + 10 N 10 M + 10 N	Käitumise ontogenees PND 22 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria PND 22 aju mass
2	6	20 M + 20 N 20 M + 20 N 20 M + 20 N 20 M + 20 N 20 M + 20 N 10 M + 10 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused Motoorne aktiivsus Suguküpsuse saabumine Motoorne ja sensoorne funktsioon Õppimine ja mälu (PND 25) Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70
3	7	20 M + 20 N 10 M + 10 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu) Noore täiskasvanu aju mass ~ PND 70
4	8	—	Reservloomad asendamiseks või lisakatseteks

^(a) Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

2. näide

6. Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 11. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks.
7. Teine komplekt loomi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) kasutatakse võõrutusjärgseteks vaatlusteks (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, suguküpsuse saabumise vanuse ning motoorse ja sensoorse funktsiooni hindamine). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
8. Noorukite ja noorte täiskasvanute kognitiivsete funktsioonide katsetamiseks kasutatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Kognitiivsete funktsioonide katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu vanuses kasutatakse erinevaid loomi. Uuringu lõpetamisel surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär, kellega olid tehtud täiskasvanuea katseid, aju eemaldatakse ja kaalutakse.
9. Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär, keda ei valitud välja katseteks, surmatakse ja kõrvaldatakse võõrutamisel.

Tabel 2

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N 10 M + 10 N	Käitumise ontogenees PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
2	6	20 M + 20 N 20 M + 20 N 20 M + 20 N 20 M + 20 N 10 M + 10 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused Motoorne aktiivsus Suguküpsuse saabumine Motoorne ja sensoorne funktsioon Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70
3	7	10 M + 10 N ^(b)	Õppimine ja mälu (PND 23)
3	7	10 M + 10 N ^(b)	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu) Noore täiskasvanu aju mass
4	8	–	Päeval PND 21 surmatud ja kõrvaldatud loomad.

^(a) Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

^(b) Kognitiivseteks katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu eas kasutatakse erinevaid järglasi (nt paarisarvulised ja paariarvulised pesakonnad kokku 20 pesakonnast).

3. näide

10. Päeval PND 11 kasutatakse aju massi ja neuropatoloogia hindamiseks üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 11, nende aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogiliseks hindamiseks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emaslooma iga doosimäära kohta.

11. Käitumise ontogeneesi (motoorne aktiivsus) vaatlusteks ja võõrutusjärgseteks vaatlusteks (motoorne aktiivsus ja suguküpsuse saabumise vanuse hindamine) ning noorukite kognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast).
12. Motoorse ja sensoorse funktsiooni katseteks (helisignaali harjumine) ja üksikasjalikeks kliinilisteks vaatlusteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
13. Noore täiskasvanukognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.

Tabel 3

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatus või katse
M	N		
1	5	10 M + 10 N 10 M + 10 N	PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria PND 11 aju mass
2	6	20 M + 20 N 20 M + 20 N 20 M + 20 N 20 M + 20 N	Käitumise ontogeneesi (motoorne aktiivsus) Motoorne aktiivsus Suguküpsuse saabumine Õppimine ja mälu (PND 27)
3	7	20 M + 20 N 20 M + 20 N 10 M + 10 N	Helisignaal (noorukid ja noored täiskasvanud) Üksikasjalikud kliinilised vaatlused Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70
4	8	20 M + 20 N 10 M + 10 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu) Noore täiskasvanu aju mass

^(a) Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

*2. liide***Mõisted**

Kemikaal – aine või segu

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

B.54. UTEROTROOFNE BIOKATSE NÄRILISTEL: KIIRE SÕELKATSE ÖSTROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS**SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 440 (2007). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja näriliste uterotroofse biokatse juhend. Näriliste uterotroofne biokatse läbis seejärel ulatusliku valideerimisprogrammi; sealhulgas koostati üksikasjalik taustadokument (2, 3) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust tugeva võrdlusöstrogeeni, nõrkade östrogenireseptori agonistide, tugeva östrogenireseptori antagonist ja mõju mitteomava võrdluskemikaali puhul (4, 5, 6, 7, 8, 9). Käesoleva katsemeetodi B.54 aluseks on kogemused, mis saadi valideerimiskatsete programmiga, ja programmi käigus östrogeniagonistidega saadud tulemused.
2. Uterotroofne biokatse on kiire sõelkatse, mis töötati välja 1930. aastatel (27, 28) ja mida esmakordselt standarditi sõelkatseks kasutamiseks 1962. aastal (32, 35). See põhineb emaka massi suurenemisel või nn uterotroofsel reaktsioonil (vt ülevaade 29). Sellega hinnatakse kemikaali võimet kutsuda esile bioloogilist mõju, mis sarnaneb looduslike östrogenide (nt 17 β -östradiooli) agonistide või antagonistide mõjuga, kuid meetodit kasutatakse hoopis sagedamini agonistide kui antagonistide leidmiseks. Emakas reageerib östrogenidele kahel viisil. Esmane reaktsioon on massi suurenemine, mida põhjustab vee imamine. Sellele järgneb massi suurenemine kudede kasvu tulemusel (30). Hiire- ja rotimaka reageerimine on kvalitatiivselt võrreldav.
3. Biokatset saab kasutada *in vivo* sõeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” osana (2. liide). Selles kontseptuaalses raamistikus on uterotroofne biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekretsioonimehhanismi, nimelt östrogensuse kohta.
4. Uterotroofne biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale. OECD valideerimisprogrammis kasutati nii tugevaid kui ka nõrku östrogeni antagonistide, et hinnata katse kasutamist östrogensete kemikaalide väljaselgitamiseks (4, 5, 6, 7, 8). Sellega tõendati meetodi tundlikkust östrogeniagonistide suhtes ja lisaks ka head laborisest ja laboritevahelist korratavust.
5. Mis puutub mõjuta (n-ö negatiivsetesse) kemikaalidesse, siis valideerimisprogrammis kasutati vaid üht mõjuta võrdluskemikaali, mille kohta oli juba varem uterotroofse analüüsi ja ka *in vitro* retseptorisidumise ja retseptori katsetega tehtud kindlaks mõju puudumine, kuid on hinnatud veel OECD valideerimisprogrammist sõltumatuid täiendavaid andmeid, mis samuti toetavad uterotroofse biokatse selektiivsust östrogeniagonistide kindlakstelemisel (16).

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

6. Östrogeni agonistid ja antagonistid toimivad östrogenireseptorite α ja β ligandidena ning võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. See võib põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reprodutiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke östrogeni agoniste või antagonistide. Kuigi ligandi afiinsus östrogenireseptori suhtes või reportergeeni transkriptsiooni aktiveerimine *in vitro* annab küll olulist teavet, on see siiski vaid üks ohtu põhjustavatest võimalikest teguritest. Muud tegurid võivad hõlmata metabolismi kaudu aktiveerimist või inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, jaotumist sihtkudedes ja väljutamist kehast, mis vähemalt osaliselt sõltub ka manustamistest ja uuritavast kemikaalidest. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku toimet *in vivo* asjakohastes tingimustes, kui kemikaali neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega seotud omadused juba ise ei paku vajalikku teavet. Emaka koed reageerivad östrogenidega stimuleerimisele kiire kasvuga, eriti laboris peetavate näriliste puhul, kus östrotsükkel kestab umbes 4 päeva. Närilisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast on närilise emakas sobiv sihtorgan, millega saab teha *in vivo* sõeluuringuid östrogeni agonistide ja antagonistide väljaselgitamiseks.
7. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuuringu kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutusid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisestes kui ka laboritevahelistes uuringutes (5, 7). Praegu on kättesaadavad kaks meetodit, nimelt eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod (OVX-adult method) ja eemaldamata munasarjadega ebaküpse emase meetod (immature method). OECD valideerimiskatsete programmiga näidati, et

nende meetodite tundlikkus ja reprodutseeritavus on võrreldavad. Meetod, milles kasutatakse ebaküpset emaslooma, kelle hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telg on kahjustamata, on siiski mõnevõrra vähem spetsiifiline, kuid selle meetodiga saab uurida laiemat mõjude spektrit kui eemaldatud munasarjadega emaslooma meetodiga, kuna see näitab ka kemikaalide mõju HAS-teljele, mitte üksnes östrogeenireseptorile. Roti HAS-telg hakkab toimima umbes 15. elupäevast. Enne nimetatud tähtaega ei saa gonadoliberiiniga (GnRH) puberteeti kiirendada. Kui emasloomad hakkavad jõudma puberteediikka, siis enne tupe avanemist on neil mitu n-ö vaikset tsüklit, millega ei kaasne tupe avanemist või ovulatsiooni, kuid kaasnevad teatavad hormoonitaseme kõikumised. Kui kemikaal otse või kaudselt stimuleerib HAS-telge, on tulemuseks enneaegne puberteet, varane ovulatsioon ja tupe varasem avanemine. Seda võivad põhjustada mitte ainult HAS-teljele toimivad kemikaalid, vaid ka mõned tavalisest suurema metabolismeeritava energia sisaldusega dieetid, mis stimuleerivad kasvu ja kiirendavad tupe avanemist, kuigi ei ole östrogeensed. Sellised kemikaalid ei tekita uterotroofset reaktsiooni täiskasvanud OVX-loomal, kuna tema HAS-telg ei tööta.

8. Loomade heaolu huvides tuleks eelistada ebaküpsete rottide meetodit, millega välditakse loomade kirurgilist eeltöötlemist ja ka selliste loomade võimalikku kasutamata jätmist, kellel esineb östruse alguse märke (vt punkt 30).
9. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult tingitud östrogeenidest, st seda võivad esile kutsuda ka kemikaalid, mis ei ole östrogeenide agonistid või antagonistid. Näiteks suhteliselt suured progesterooni, testosterooni või mitmesuguste sünteetiliste kollaskehahormoonide doosid võivad kõik põhjustada seda reaktsiooni (30). Igasugust reaktsiooni tuleb uurida histoloogiliselt tupe keratinisatsiooni ja sarvestumise suhtes (30). Olenemata reaktsiooni võimalikust põhjusest tuleks uterotroofse biokatse positiivse tulemuse puhul algselt teha täiendav uuring selguse saamiseks. Täiendavaid tõendeid östrogeensuse kohta võib saada *in vitro* katsetega, nagu östrogeenireseptori sidumise katse ja transkriptsiooni aktivatsiooni katse või muud *in vivo* uuringud, näiteks emasloomade puberteedi katse.
10. Kui võtta arvesse, et uterotroofne biokatse on ette nähtud *in vivo* sõeluuringuks, on kontrollimisviisi valikul lähtutud nii loomade heaoluga seotud kaalutlustest kui ka korrastatud astmelise katsetamise strateegiast. Sel eesmärgil püüti hoolikalt kontrollida, kuivõrd korratavalt ja tundlikult lubab meetod kindlaks teha östrogeensust, mis on paljude kemikaalide puhul peamine mure; vähem pöörati tähelepanu katsega antiöstrogeensuse tõendamise küljele. Katsetati ainult ühte tugevat antiöstrogeeni, kuna selgelt teadaolevate antiöstrogeensete kemikaalide (millel ei ole mingit varjavat östrogeenset mõju) on väga piiratud. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse seega östrogeensete omaduste tuvastamist; antagonistliku toime tuvastamist on käsitletud ühes juhenddokumendis (37). Biokatse korratavus ja tundlikkus puhtalt antiöstrogeense toimega kemikaalide puhul määratletakse täpsemalt hiljem, kui katset on tavameetodina mõnda aega kasutatud ja leitud rohkem sellise toimeviisiga kemikaale.
11. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomakaitse kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humanse kohtlemise täiendavad juhendid (25).
12. Nagu elusloomadega tehtavate katsete puhul tavaliselt, on enne katse algust oluline tagada, et andmed on tõepoolest vajalikud. Andmed võivad olla tõeliselt vajalikud näiteks järgmiste kahe olukorra puhul:
 - suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase, vt 2. liide) või kaudsed andmed kemikaali östrogeensuse kohta (2. tase), mille tõttu on vaja uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;
 - toimed, mis näitavad östrogeensust 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja millest selgub, et mõjud on seotud östrogeense mehhanismiga, mida ei saa uurida *in vitro* katsetes.
13. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

14. Uterotroofse biokatse tundlikkuse aluseks on loomkatsesüsteem, milles hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg ei funktsioneer, mistõttu vereringes on vähe endogeenset östrogeeni. See tagab emaka väikse massi mõjutaja puudumisel (nn nulljoon) ja maksimaalse reageerimise manustatud östrogeenidele. Näriliste emasloomadel esineb sellist östrogeenitundlikku seisundit kahes olukorras:
- i) ebaküpsed emasloomad pärast võõrutamist ja enne puberteeti, ning
 - ii) noored täiskasvanud emasloomad pärast munasarjade eemaldamist, kui on antud piisavalt aega emaka taandarenguks.
15. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Uuritava kemikaali eri doose manustatakse vähemalt kahele katseloomade doosirühmale (vt punkt 33), kasutades kummaski rühmas oma doositaset ja manustamist kolmel järjestikusel päeval ebaküpsede emasloomade meetodi puhul ja vähemalt kolmel järjestikusel päeval täiskasvanud OVX-emasloomade meetodi puhul. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Östrogeeni agonistide leidmiseks hinnatakse kemikaali saanud loomade keskmist emaka massi ja võrreldakse kandeainet saanud loomade rühma vastava näitajaga, et leida statistiliselt olulist suurenemist. Emaka keskmise massi statistiliselt oluline suurenemine osutab, et kõnealuse biokatse vastus on positiivne.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

16. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate näriliseliinide loomi. Valideerimiseks kasutati näiteks Wistari ja Sprague-Dawley liini rotte. Ei tohiks kasutada selliste liinide emasloomi, kelle emakas on või arvatakse olevat vähem tundlik. Labor peaks tõendama liini tundlikkust, nagu on kirjeldatud punktides 26 ja 27.
17. Uterotroofseks biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte ja hiiri. OECD valideerimisüüringud tehti ainult rottidega, lähtudes arusaamast, et neid liike võib pidada samaväärseks ja seepärast piisab ülemaailmseks valideerimiseks katsetest ühe liigi loomadega, kuna sellega säästetakse vahendeid ja loomi. Rott valitakse katseloomaks enamiku reproduktiiv- ja arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringutes. Arvestades seda, et hiirte kohta on olemas ulatuslik varasema kasutuse andmebaas, ja selleks, et laiendada näriliste uterotroofse biokatse kasutamist ka hiirtele kui katseliigile, tehti piiratud valideerimisüüring hiljem ka hiirtel (16). Kuna peamine soov oli hoida kokku vahendeid ja loomi, valiti võrdlusmeetod, milles kasutati piiratud arvu uuritavaid kemikaale ja osalevaid laboreid ning ei kasutatud koodiga tähistatud näidiste katsetamist. Kõnealune uterotroofse biokatse võrdlev valideerimisüüring näitab, et noorte täiskasvanud OVX-hiirte puhul on rottide ja hiirtega saadud andmed omavahel kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt heas kooskõlas. Kui uterotroofse biokatse tulemus on pikema uuringu eelkatse, võimaldab selline kooskõla kasutada mõlemas uuringus sama liini samast allikast pärinevaid loomi. Võrdleva lähenemisviisi juures piirduti OVX-hiirte kasutamisega ja katsed ei andnud töökindlaid andmeid, mis oleksid võimaldanud valideerida meetodi ka ebaküpsede emasloomade mudeli jaoks, seepärast ebaküpsede hiirte mudelit käesoleva katsemeetodi raames ei vaadelda.
18. Seega võib mõnel juhul rottide asemel kasutada hiiri. Hiirte kasutamist tuleks põhjendada, lähtudes toksikoloogilistest, farmakokineetilistest ja/või muudest kriteeriumidest. Hiirte korral võib olla vaja muuta katse-eeskirja. Näiteks kasutavad hiired oma kehamassi kohta rohkem sööta ja seepärast peab sööda fütoöstrogeenisaldus olema hiirte puhul madalam kui rottide puhul (9, 20, 22).

Pidamis- ja söötmistingimused

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hool-duse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutata-vate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes ülimuslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ±3 °C). Suhteline õhuniiskuse peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.
20. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Noori täiskasvanud loomi võib hoida puurides eraldi või kuni kolmest loomast koosneva rühmana. Ebaküpsede loomade nooruse tõttu soovitatakse neid pidada puurides sotsiaalsete rühmadena.

21. On teada, et fütoöstrogeenide suur sisaldus laborisöödas suurendab näriliste emaka massi sedavõrd, et see segab uterotroofse biokatse tegemist (13, 14, 15). Fütoöstrogeenide ja metaboliseeritava energia kõrge tase kasutatavas söödas võib ebaküpsete loomade korral põhjustada ka varast puberteeti. Laborisöödas on fütoöstrogeene peamiselt siis, kui söödaks kasutatakse soja- ja lutsernitooteid, ning on näidatud, et fütoöstrogeenide tase võib sõltuda standardse laborisööda partiist (23). Kehamass on oluline muutuja, kuna tarbitav sööda kogus on seotud kehamassiga. Seetõttu võib tegelik saadav fütoöstrogeenide doos sama sööda juures sõltuda loomaliigist ja vanusest (9). Ebaküpsete emasrottide puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu kaks korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasloomade puhul. Noorte täiskasvanud hiirte puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu neli korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasrottide puhul.
22. Uterotroofse biokatse tulemused (9, 17, 18, 19) näitavad siiski, et piiratud koguse fütoöstrogeenide olemasolu söödas on lubatav ja ei vähenda biokatse tundlikkust. Juhinduda tuleks sellest, et söödaga saadav fütoöstrogeenide kogus ei ületaks 350 µg genisteiiniekvivalenti laborisööda grammi kohta ebaküpsete Sprague-Dawley ja Wistari rottide puhul (6, 9). Selline sööt peaks samuti sobima katse tegemisel noorte täiskasvanud OVX-rottidega, kuna nende söödatarbimine kehamassi kohta on väiksem kui ebaküpsel loomadel. Kui kasutatakse täiskasvanud OVX-hiiri või fütoöstrogeenide suhtes tundlikumaid rotte, tuleb sööda fütoöstrogeenisaldust vastavalt vähendada (20). Lisaks võivad eri söötade kättesaadava metaboliseeritava energia erinevused põhjustada puberteedi algust eri vanuses (21, 22).
23. Enne uuringut tuleb hoolikalt valida sööt, mille fütoöstrogeenide tase ei oleks liiga kõrge (vt juhendid 6, 9) või milles ei oleks liiga palju metaboliseeritavat energiat, mis võib moonutada tulemusi (15, 17, 19, 22, 36). Laboris kasutatava katsesüsteemi õige toimimise tagamine, nagu on täpsustatud punktides 26 ja 27, on oluline mõlema teguri kontrolli alla võtmiseks. Hea laboritava kohane kaitsemeede on võtta uuringu ajal manustatava sööda igast partiist representatiivsed proovid, et oleks võimalik teha fütoöstrogeenisalduse analüüse (nt kui kontrollrühma keskmine emaka mass on suurem kui varasemate kontrollrühmade puhul või kui katsest standardöstrogeeni 17α-etinüülöstradiooliga saadakse ebasobiv tulemus). Uuringu käigus tuleks teha alikvootide analüüs või need külmutada -20 °C juures või säilitada nii, et proovid ei laguneks enne analüüsimist.
24. Mõned allapanumaterjalid võivad sisaldada looduslikult esinevaid östrogeenseid või antiöstrogeenseid kemikaale (nt on teada, et maisitõlvik mõjutab emasrottide tsükli ja näib olevat antiöstrogeenne). Valitud allapanumaterjal peaks sisaldama võimalikult vähe fütoöstrogeene.

Loomade ettevalmistamine

25. Katseks valitakse loomad, kel ei esine mingeid haigusnähte ega füüsilisi kõrvalekaldeid, ja need jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja doosirühmadesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Loomadele tuleks anda kordumatu märgis. Ebaküpsed loomad peaksid eelistatavalt olema kuni võõrutamiseni puurides koos oma ema või kasuemaga. Kohanemisaeg enne uuringu algust peaks olema umbes 5 päeva noorte täiskasvanud loomade puhul ja ebaküpsete loomade puhul, kes on tarnitud koos oma ema või kasuemaga. Kui ebaküpsed loomad ostetakse ilma emata kohe pärast võõrutamist, võib olla vajalik kasutada lühemat kohanemisaega, kuna dooside manustamine peaks algama kohe pärast võõrutamist (vt punkt 29).

KATSE KORRALDUS

Labori pädevuse kontrollimine

26. Labori pädevuse kontrollimiseks saab kasutada kahte meetodit:
- perioodiline kontrollimine, mille aluseks on algse nulljoone positiivse kontrolli katse (vt punkt 27). Vähemalt iga 6 kuu järel ja iga kord, kui toimub muutus, mis võib mõjutada katse usaldusväärsust (nt uus laborisööda koostis, uus lahkamist teostav isik, loomaliini või loomade tarnija vahetamine jne) tuleks kontrollida katsesüsteemi (loommudeli) tundlikkust, kasutades nulljoone positiivse kontrolli katset, mida on kirjeldatud punktis 27 ja võrdlusöstrogeeni 17α-etinüülöstradiooli (CASi nr 57-63-6) (EE) sobivat doosi;
 - samaaegsete kontrollkatsete tegemine, milleks nähakse igas katses ette rühm, kellele manustatakse sobiv doos võrdlusöstrogeeni.

Kui süsteemi reaktsioon ei vasta ootustele, tuleb uurida katsetingimusi ja neid vastavalt muuta. On soovitatav, et kummagi lähenemisviisi puhul kasutatav võrdlusöstrogeeni doos oleks ligikaudu 70–80 efektiivdoosi.

27. **Nulljoone positiivse kontrolli katse.** Enne kui labor teeb käesoleva katsejuhendi järgi esimese katse, tuleks tal tõendada oma pädevust. Selleks uuritakse loomumodeli reageerimist võrdlusöstrogeeni 17 α -etiinüülöstradiooli (CASI nr 57-63-6) (EE) vähemalt neljale doosile. Emaka massi suurenemist võrreldakse varasemate kontrollitud andmetega (vt viide 5). Kui kõnealune nulljoone positiivse kontrolli katse ei anna oodatud tulemusi, tuleb katsetingimused üle vaadata ja neid muuta.

Loomade arv ja seisund

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma (nii ebaküpse emaslooma kui ka täiskasvanud OVX-emaslooma eeskirja puhul).

Ebaküpsete loomade vanus

29. Ebaküpsete loomade uterotroofse biokatse tegemisel peab olema täpsustatud loomade sünni kuupäev. Dooside manustamisega tuleks alustada piisavalt vara, et uuritava kemikaali manustamise lõpuks ei oleks puberteediga seotud endogeensete östrogeenide taseme tõus veel alanud. Teisest küljest on tõendeid, et väga noored loomad võivad olla vähem tundlikud. Optimaalse vanuse kindlaksmääramiseks peaks iga labor võtma arvesse oma varasemaid tulemusi suguküpsuse saavutamise kohta.

Üldise suunisena võib rottidele dooside manustamist alustada kohe pärast varast võõrutamist, st 18. päeval pärast sündi (sünnimise päev loetakse sünnijärgseks päevaks 0). Dooside manustamine rottidele tuleks eelistatult lõpetada 21. sünnijärgsel päeval ja igal juhul enne 25. sünnijärgset päeva, kuna pärast seda päeva hakkab hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg toimima ja endogeensete östrogeenide tase võib hakata tõusma, millele vastavalt hakkab suurenema keskmine nulljoone emaka mass ja rühma standardhälve (2, 3, 10, 11, 12).

Munasarjade eemaldamise kord

30. Eemaldatud munasarjadega rottide ja hiirte saamiseks (doosi- ja kontrollrühmad) tuleb emasloomal eemaldada munasarjad vanuses 6–8 nädalat. Roti puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 14 päeva, et emakas saaks taandareneda miinimumini ehk stabiilse nulljooneni. Hiire puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 7 päeva. Kuna östrogeenide taseme tõstmiseks veres piisab juba väiksest kogusest munasarjakoest (3), tuleks loomi enne kasutamist kontrollida tupe-tampooniprooviga saadud epiteliaalrakkude vaatlemisega vähemalt viiel järjestikusel päeval (nt päevad 10–14 pärast roti emaslooma munasarjade eemaldamist). Kui loomal esineb algava östruse tunnuseid, ei tohiks teda katseks kasutada. Lisaks tuleb lahingul uurida munasarjade kunagisi kinnituskohi munasarjakoe leidmiseks. Kui sellist kude leitakse, et tohiks looma andmeid arvutustes kasutada (3).
31. Munasarjade eemaldamiseks loom tuimestatakse korralikult ja pannakse lamama kõhuli. Sisselõige, millega avatakse kõhuõõne dorsolateraalne sein, peaks olema pikkusega umbes 1 cm ja asuma alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskel ning mõni millimeeter külgmiselt niudelihase välimisest servast. Munasari tuleks eemaldada kõhuõõnest aseptilisele alale. Munasari tuleks eraldada munajuha ja emakakeha kokkupuutekohalt. Kui on tehtud kindlaks, et massiivset verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või sobiva õmblusega. Niidiga sidumise kohad on skemaatiliselt näidatud joonisel 1. Tuleb kasutada asjakohast operatsioonijärgset tuimestust, vastavalt näriliste ravis kogenud veterinaararsti soovitudele.

Kehamass

32. Täiskasvanud OVX-emaslooma meetodi kasutamisel ei ole kehamass ja emaka mass omavahel seotud, kuna emaka massi mõjutavad hormoonid, nagu östrogeenid, kuid mitte kasvutegurid, mis reguleerivad keha suurust. Seevastu ebaküpse emaslooma kasutamisel on kehamass seotud emaka massiga küpsemise ajal (34). Uuringu alguses peaks loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ega tohiks ebaküpse emaslooma meetodi kasutamisel ületada

± 20 % keskmisest kehamassist. See tähendab, et loomade kasvataja peaks standardima pesakonna suuruse, et eri emasloomade järglased saaksid umbes ühepalju toitu. Loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Tuleks jälgida, et sama pesakonna liikmeid ei määrataks samasse doosirühma, kuivõrd see on võimalik ilma uuringus kasutatavate pesakondade arvu suurendamiseta.

Doseerimine

33. Selleks et teha kindlaks, kas uuritaval kemikaalil võib *in vivo* olla östrogeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ja ühest kontrollrühmast; seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale östrogeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava aine manustamisel kasutatakse kandeainet, peaks kontrollrühm saama doosirühmadega võrdses koguses kandeainet (või kui doosirühmades kasutatakse erinevaid koguseid, siis neist suurima koguse).
34. Uterotroofse biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise ning mis ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kolmel järjestikusel päeval maksimumdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Kõrgeima doosimäära puhul tuleks kõigepealt arvestada LD50 väärtust ja/või andmeid ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi ja stressi (24, 25, 26). Suurim doos peaks vastama suurimale talutavale doosile; uuringu võib teha ka doosi suuruse juures, mis põhjustab positiivse uterotroofse reaktsiooni. Kuna see on sõelkatse, siis võib üldiselt kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi kuni 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse.
35. Teiselt poolt, kui agonisti östrogeenseid omadusi on võimalik hinnata *in vitro* (või *in silico*) andmetest, võib neid doosi valimisel arvesse võtta. Näiteks määratakse uuritava kemikaali kogus, mis uterotroofses biokatses põhjustab võrdlusagonisti (etinüülöstradiool) mõjuga ekvivalentse reaktsiooni, tema suhtelise tõhususe järgi *in vitro*, võrreldes etinüülöstradiooliga. Kõrgeim katses kasutatav doos leitakse selle ekvivalentse doosi korrutamisel sobiva teguriga, näiteks 10 või 100ga.

Vahemiku leidmise kaalutlused

36. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosivahemiku leidmiseks. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti nr 19 (25), milles on määratletud mürgisusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib emakad pärast kolmepäevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võiks seejärel kasutada põhiuuringu kava koostamiseks (et valida sobivad suurim ja väiksem doos ja vajalik doosirühmade arv).

Dooside manustamine

37. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaolu kaalutlusi, toksikoloogia aspekte (kuivõrd asjakohane on teatav manustamistee, arvestades inimese kemikaaliga kokkupuute viise (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid sissehingamisele või naha kaudu imendumisele), uuritava materjali füüsikalisi ja keemilisi omadusi ning eriti olemasolevaid toksikoloogilisi andmeid ning andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral).
38. Soovitatav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna enamik östrogeenseid ligande või nende metaboolseid eellasi on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Need õlid on eri kalorsuse ja rasvasisaldusega, seega võib kandeaine mõjutada üldist metaboliseeritava energia omastamist, mille tõttu võivad muutuda mõõdetavad näitajad, nagu emaka mass, eeskätt ebaküpse emaslooma meetodi puhul (33). Seepärast tuleb enne

uuringut katsetada kandeainet ja võrrelda kontrollrühmaga, kellele ei anta kandeainet. Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökonsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peavad olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealikkvoodi ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused.

39. Doosi manustamise ajastus sõltub kasutatavast mudelist (vt punkt 29, ebaküpse emaslooma mudel, ja punkt 30, täiskasvanud OVX-emaslooma mudel). Ebaküpsetele emasrottidele manustatakse uuritavat kemikaali iga päev kolmel järjestikusel päeval. Kolmepäevast dooside manustamist soovitatakse ka täiskasvanud OVX-emasrottide puhul, kuid sel juhul on lubatav ka pikem kokkupuude ja nii saab paremini avastada nõrga toimega kemikaale. Täiskasvanud OVX-emashiirte puhul peaks 3-päevane manustamine olema piisav ja manustamise pikendamisel seitsme päevani ei ole tugevate östrogeeniagonistide puhul erilisi eeliseid, kuid valideerimisuuringus näidati, et nõrkade agonistidega see nii ei ole (16), seepärast tuleks OVX-emashiirte puhul pikendada dooside manustamist kuni 7 järjestikuse päevani. Doos tuleks manustada iga päev samal kellaajal. Doose tuleks vajaduse korral kohandada, et säilitada konstantset doosimäära looma kehamassi suhtes (nt mg uuritavat kemikaali ühe kg kehamassi kohta päevas). Katses kasutatava lahuse mahu muutumine tuleks hoida minimaalne; tuleks muuta uuritava aine lahuse kontsentratsiooni, et tagada ühesugune lahuse maht kehamassi suhtes kõikide dooside ja manustamisviiside puhul.
40. Kui uuritavat kemikaali manustatakse loomadele sundsöötmisega, tuleks seda teha ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Suurim vedeliku maht, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada kuni 10 ml kehamassi kg kohta.
41. Kui uuritavat kemikaali manustatakse nahaaluse süstiga, tuleks päevane doos manustada üheainsa süstiga. Doose tuleks manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõela (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljaimbumine või doosi mittetäielik manustamine. Rotile päevas süstitav lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, mis jagatakse kahe süstekoha vahel; vesilahuste puhul võib erandina süstida 10 ml kehamassi kg kohta.

Vaatlused

Üld- ja kliinilised vaatlused

42. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul jälgitakse suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).

Kehamass ja sööda tarbimine

43. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmissaadmete kaalumise. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

Lahkamine ja emaka massi mõõtmine

44. Kakskümmend neli tundi pärast viimase doosi manustamist rotid surmatakse humaanselt. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamine teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid natuke mõjutada. Biokatse eesmärk on mõõta nii märja emaka kui ka kuivatatud emaka mass. Märkmass hõlmab emaka ja selle valendikus oleva vedeliku massi. Kuivatatud emaka mass mõõdetakse pärast selle valendikus oleva vedeliku väljapigistamist ja kõrvaldamist.

45. Ebaküpsete emasloomade puhul uuritakse enne lahkamist tuppe, et teha kindlaks tupe võimalik avanemine. Lahkamist alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eemaldatakse emakasarved ja munasarjad, kui viimased on olemas, kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused päraku ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupe-suudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupeseina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel 2. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast kehast eemaldamist tuleks emakat käsitseda piisavalt kiiresti, et vältida kudede kuivamist. Massikadu kuivamise tõttu muutub olulisemaks just väikeste kudede nagu emaka puhul (23). Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohti uurida munasarjakoe leidmiseks. Liigne rasv ja sidekude tuleks ära lõigata. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel 2.
46. Iga emakas tuleks paigutada kordumatu märgisega teadaoleva massiga anumasse (nt Petri tass või plastikust kaalumismõõdu), jälgides kogu aeg, et koed ei enne kaalumist ära ei kuivaks (nõusse võib panna näiteks soolalahusega kergelt niisutatud filterpaberi). Emakas koos valendikus oleva vedelikuga kaalutakse täpsusega 0,1 mg (märja emaka mass).
47. Seejärel töödeldakse eraldi iga emakat, et eemaldada valendikus olev vedelik. Mõlemad emakasarved torgatakse läbi või lõigatakse pikuti lõhki. Emakas pannakse kergelt niisutatud filterpaberile (nt Whatman nr 3) ja pressitakse kergelt teise kergelt niisutatud filterpaberiga valendikus oleva vedeliku täielikuks eemaldamiseks. Emakas ilma valendikus oleva vedelikuta kaalutakse täpsusega 0,1 mg (kuivatatud emaka mass).
48. Katse lõpetamisel määratud emaka massi võib kasutada selle tõendamiseks, et ebaküpse opereerimata roti katses kasutamise sobivat vanust ei ületatud, kuid laboris kasutatava rotiliini varasemad andmed on selles suhtes otsustava tähtsusega (vt tulemuste tõlgendamine, punkt 56).

Vabavalikulised uuringud

49. Pärast kaalumist võib emaka fikseerida neutraalse puhvriga 10 % formaliinilahuses, et seda saaks histopatoloogiliselt uurida pärast värvimist hematoksiliini ja eosiiniga. Ka tuppe võib samal viisil uurida (vt punkt 9). Lisaks võib teha morfoomeetrilise mõõtmise endomeetriumi epiteeli kvantitatiivseks võrdlemiseks.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

50. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist:
- loomade arv katse alguses,
 - surnuna leitud või katse jooksul humaansetel põhjustel surmatud loomade arv ja koodnumbrid ning iga looma surma või humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg,
 - mürgistustunnustega loomade arv ja koodnumbrid ning tunnuste kirjeldus, sealhulgas toksilise toime täheldatud algushetk, kestus ja raskusaste, ning
 - kahjustustega loomade arv ja koodnumbrid ning kahjustuste tüübi kirjeldus.
51. Iga looma kohta registreeritakse kehamass, märja emaka mass ja kuivatatud emaka mass. Selleks, et teha kindlaks, kas uuritava kemikaali manustamine põhjustas statistiliselt olulise ($p < 0,05$) emaka massi suurenemise, tuleks agonistide puhul kasutada ühepoolset statistilist analüüsi. Kuivatatud emaka massi ja märja emaka massi suurenemist tuleks analüüsida asjakohaste statistiliste meetoditega, et kindlaks teha kemikaali manustamisega seotud suurenemine. Näiteks võib andmeid hinnata kovariatsioonianalüüsi (ANCOVA) lähenemisviisi abil, kus kaasmuutujaks on kehamass lahkamise ajal. Enne andmete analüüsi võib emaka andmed logaritmiliselt teisendada dispersiooni stabiilsuse suurendamiseks. Iga doosirühma paariviiliseks võrdlemiseks kontrollrühmaga ja usaldusvahemiku leidmiseks sobivad Dunnetti ja Hsu test. Võimalike võõrväärtuste leidmiseks ja dispersiooni homogeensuse

hindamiseks võib kasutada jääkhälvete töötlemist Studenti teljestikus. Neid meetodeid kasutati OECD valideerimisuringus, milles kasutati statistilise analüüsi süsteemi programmi PROC GLM (SAS Institute, Cary, NC), versioon 8 (6, 7).

52. Lõpp-protokollis esitatakse järgmine.

Uurimislabor:

- vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringu tegemisel;
- nulljoone positiivse kontrolli andmed ja perioodilise positiivse kontrolli andmed (vt punktid 26 ja 27).

Uuritav kemikaal:

- uuritava kemikaali iseloomustus;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- lahjenduste valmistamise meetod ja sagedus;
- kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;
- kõik manustamislahuste analüüsid.

Kandeaine:

- kandeaine iseloomustus (olek, tarnija ja partii);
- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

- liik, liin ja nende valimise põhjendus;
- tarnija ja tema konkreetne käitis;
- loomade vanus tarnimise ajal ja sünnikuupäev;
- ebaküpsete loomade puhul: kas tarniti koos ema või kasuemaga ja võõrutamise kuupäev;
- loomade kohanemise korra üksikasjad;
- loomade arv puuris;
- üksikloomade ja rühma märgistamise üksikasjad ja meetod.

Katse tingimused:

- randomiseerimise üksikasjad (st kasutatud juhuvaliku meetod);
- doosi valimise põhjendused;
- uuritava kemikaali doseerimisvormi üksikasjad, saavutatud kontsentratsioon, stabiilsus ja homogeensus;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;
- sööt (nimetus, tüüp, tarnija, koostis ja, kui see on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);
- vee päritolu (nt kraanivesi või filtritud vesi) ja loomadele kättesaadavaks tegemine (torude kaudu suurest mahutist, pudelist jne);
- allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);
- puurides pidamise tingimused, valgustusaeg, ruumi temperatuur ja õhuniiskus, ruumi koristamine;
- lahkamise ja emaka kaalumise korra üksikasjalik kirjeldus;
- statistiliste töötluste kirjeldus.

*Tulemused**Iga looma kohta:*

- iga looma kehamass igal päeval (rühmadesse jagamisest kuni lahkamiseni) (täpsusega 0,1 g);
- iga looma vanus (päevades, lugedes sündimise päeva 0-päevaks) selleks ajaks, kui algas uuritava kemikaali manustamine;
- iga doosi manustamise kuupäev ja kellaaeg;
- manustatud doosi suurus ja arvutatud ruumala ning kõik tähelepanekud kadude kohta doosi manustamisel või pärast manustamist;
- igapäevased andmed looma olukorra kohta, kõik asjakohased sümptomid ja tähelepanekud;
- oletatav surma põhjus (kui loom uuringu ajal oli suremas või suri);
- humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg ning ajavahemik pärast viimast manustamist;
- märja emaka mass (täpsusega 0,1 mg), tähelepanekud valendikus olnud vedeliku kadude kohta lahkamise ja kaalumiseks ettevalmistamise ajal;
- kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg).

Iga loomade rühma kohta:

- keskmine kehamass igal päeval (täpsusega 0,1 g) ja standardhälbed (rühmadesse määramisest kuni lahkamiseni);
- keskmine märja emaka mass ja keskmine kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg) ja standardhälbed;
- kui mõõdeti, siis igapäevane sööda tarbimine (arvutatuna tarbitud sööda grammides looma kohta);
- statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud märja emaka ja kuivatatud emaka massi doosirühmades ja kandeainet saanud rühmades;
- statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud doosirühmade loomade üldist kehamassi ning kehamassi suurenemist märja emaka ja kuivatatud emaka massiga ja kõrvutatud neid tulemusi kandeainet saanud kontrollrühmade asjaomaste näitajatega.

53. Katsemeetodi oluliste suunavate faktide kokkuvõte

	Rott	Häär
Loomad		
Liin	Tavaliselt kasutatav laborinäriliste liin	
Loomade arv	Vähemalt 6 looma ühes doosirühmas	
Rühmade arv	Vähemalt 2 doosirühma (vt punkt 33 juhiste saamiseks) ja negatiivne kontrollrühm Vt punktid 26 ja 27, juhised positiivse kontrollkatse rühmade kohta	
Pidamis- ja söötmingimused		
Loomade ruumi T°	22 °C ± 3 °C	
Suhteline õhuniiskus	50–60 %, mitte alla 30 % ega üle 70 %	
Ööpäeva valgustusrežiim	12 tundi valgust, 12 tundi pimedust	
Sööt ja joogivesi	Ad libitum	

	Rott	Hiir
Majutus puurides	Üksi või kuni kolmest loomast koosnevate rühmadena (ebaküpseid loomi soovitatakse pidada sotsiaalsete rühmadena)	
Sööt ja allapanu	Sööda ja allapanu fütoöstrogeenide sisaldus peaks olema väike	
Katse-eeskiri		
Meetod	Ebaküpsete eemaldamata munasarjadega loomade meetod (eelistatud valik). Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod	Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod
Ebaküpsete loomade vanus dooside manustamisel	Vähemalt PND 18. Dooside manustamine tuleb lõpetada enne päeva PND 25.	Praeguse meetodi puhul ei ole asjakohane.
Vanus munasarjade eemaldamisel	Vanuses 6–8 nädalat.	
Eemaldatud munasarjadega loomade vanus dooside manustamisel	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 14 päeva.	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 7 päeva.
Kehamass	Kehamassi erinevused peaksid olema minimaalsed, mitte üle ±20 % keskmisest kehamassist	
Doseerimine		
Manustamistee	Suukaudne sond või nahaalne süst	
Manustamise sagedus	Ühekordne päevane doos	
Sondiga ja süstimisega manustatav ruumala	≤ 5 ml kehamassi kg kohta (või vesilahuste puhul kuni 10 ml kehamassi kg kohta) (kahte süstimiskohta nahaalse manustamise puhul)	
Manustamise kestus	Ebaküpsete loomade puhul 3 järjestikusel päeval OVX-loomade puhul vähemalt 3 järjestikusel päeval	OVX-loomade puhul 7 järjestikusel päeval
Lahkamisaeg	Ligikaudu 24 tundi pärast viimast doosi	
Tulemused		
Positiivne vastus	Keskmise emakamassi statistiliselt oluline suurenemine (märja ja/või kuivatatud emaka mass)	
Võrdlusöstrogeen	17α-etiinüülöstradiool	

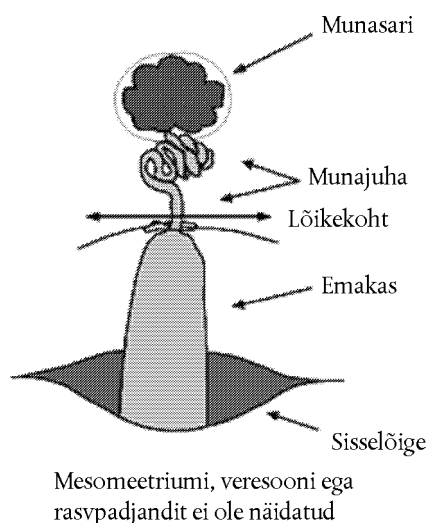
TULEMUSTE TÕLGENDAMISE JA KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED

54. Üldiselt tuleks östrogeensuse test lugeda positiivseks, kui tuvastatakse statistiliselt oluline emakamassi suurenemine ($p < 0,05$) vähemalt suure doosi rühmas, võrreldes lahusti kontrollrühmaga. Positiivset tulemust toetab täiendavalt bioloogiliselt usutav sõltuvus doosi ja toime ulatuse vahel, pidades aga silmas, et uuritava kemikaali kattuvad östrogeensed ja antiöstrogeensed toimed võivad mõjutada uuritava kemikaali doosi-toime sõltuvuse kuju.
55. Tuleb jälgida, et ei ületataks suurimat talutavat doosi, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid.

56. Oluline asjaolu uterotroofse biokatse tulemuste kehtivaks tunnistamisel on emaka mass kandeaine kontrollrühma liikmetel. Suur emaka mass kontrollrühma liikmetel võib panna kahtluse alla biokatse tundlikkuse ja võime tuvas-tada väga nõrku östrogeneeni agoniste. Kirjandusülevaated ja uterotroofse biokatse valideerimise käigus kogutud andmed osutavad, et kontrollrühma emakamassi kõrge keskmine esineb spontaanselt, eriti ebaküpsete loomade puhul (2, 3, 6, 9). Kuna ebaküpse roti emaka mass sõltub mitmest muutujast, nagu stress või kehamass, ei ole võimalik anda kindlat emaka massi ülempiiri. Juhindumiseks: kui ebaküpsete rottide kontrollrühmas emaka mass on 40–45 mg, tuleks tulemusi pidada kahtlaseks, ja emaka mass üle 45 mg võib tähendada, et katset tuleks korrata. Siiski tuleb seda kaalutleda iga juhtumi puhul eraldi (3, 6, 8). Täiskasvanud rottidega katsete tegemisel võib munasarjade puudulikul eemaldamisel jääda alles munasarjakude, mis võib nõristada endogeenseid östrogeene ja aeglustada emakamassi taandarengut.
57. Kandeaine kontrollrühma kuivatatud emaka mass, mis on väiksem kui 0,09 % roti ebaküpse emaslooma kehamas-sist ja väiksem kui 0,04 % roti eemaldatud munasarjadega noore täiskasvanud emaslooma kehamassist, näib andvat vastuvõetavaid tulemusi (vt tabel 31 (2)). Kui kontrollrühmas on emaka mass suurem kui kõnealused arvud, tuleks analüüsida eri tegureid, nagu loomade vanus, munasarjade eemaldamise nõuetekohasus, söödaga saadavad fütoöstrogeenid jne), ja katse negatiivset tulemust (östrogeense toime puudumine) tuleks võtta ettevaatu-sega.
58. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemad andmed. Samuti tuleks laboris säilitada andmed selliste võrdlusöstrogeenide nagu 17 α -etinüülöstradiool poolt esilekutsutud reaktsiooni kohta. Labor võib teha katseid ka teadaolevalt nõrga östrogeneeni agonisti reaktsiooni määramiseks. Kõiki neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate andmetega (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), et veenduda selles, et labori meetod on piisavalt tundlik.
59. Kuivatatud emaka massi varieeruvus oli OECD valideerimisuurinus väiksem kui märja emaka massi puhul (6, 7). Kuid kummagi näitaja väärtuste tugev suurenemine viitab siiski sellele, et uuritav aine on östrogeense toime poolest positiivne.
60. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult östrogeense päritoluga, kuid uterotroofse biokatse positiivset tulemust tuleks üldiselt tõlgendada kui tõendit võimaliku östrogeensuse kohta *in vivo*, ja see peaks tavaliselt andma põhjust selle küsimuse edasiseks täpsustamiseks (vt punkt 9 ning „Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kont-rollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik“, 2. lisa).

Joonis 1

Skeem munasarjade kirurgilise eemaldamise kohta

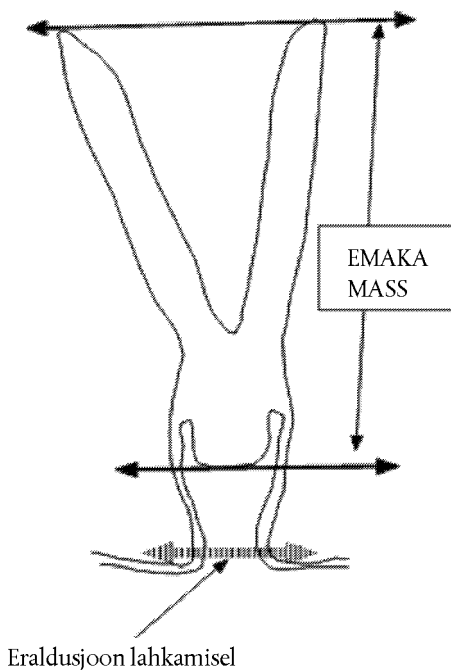


Operatsioon algab kõhuõõne dorsolateralse seina avamisega alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskpunktis ning mõne millimeetri kaugusel niudelihase välimisest servast. Kõhuõõnes tuleks leida munasarjad. Munasarjad eemaldatakse seejärel füüsiliselt kõhuõõnest aseptilisele alale, munasarja ja emaka vahele pannakse

ligatuur verejooksu vältimiseks ning munasari eemaldatakse sisselõikega ligatuuri kohalt kummagi munajuha ja emakasarve ühinemiskohast. Kui on tehtud kindlaks, et olulist püsivat verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või õmblusega. Loomadel lastakse paraneda ja emakal taandareneda vähemalt 14 päeva enne katses kasutamist.

Joonis 2

Emakakudede eemaldamine ja ettevalmistamine massi määramiseks.



Tööd alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eraldatakse kumbki munasari ja emakasarv kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused pära- ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupesuuudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupeseina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteeriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast emaka eemaldamist lõigatakse ära liigne rasv ja sidekude. Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohati uurida munasarjakoe leidmiseks. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel. Emaka võib seejärel kaaluda.

1. liide

MÕISTED

Antiöstrogeensus – kemikaali võime alla suruda 17β-etinüülöstradiooli toimet imetajate organismile.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Uterotroofse biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (nt mg kehamassi kg kohta päevas).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

Kemikaal – aine või segu.

Maksimaalne talutav doos(*Maximum Tolerable Dose, MTD*) – suurim kemikaali kogus, mis katselooma kehasse viiduna ei põhjusta katselooma surma (tähis LD₀) (IUPAC, 1993).

Spetsiifilisus – kõikide negatiivsete/toimeta ainete osakaal, mis katsemeetodi abil klassifitseeritakse õigesti. See on tõhususe näitaja katsemeetodi puhul, mis näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

Sünnijärgne päev X – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

Sünnikuupäev – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

Tundlikkus – kõikide positiivsete/toimivate ainete osakaal, mis klassifitseeritakse katsemeetodi abil õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

Uterotroofne – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju emaka kudede kasvule.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Östrogeensus – kemikaali võime avaldada imetaja organismile 17β-etinüülöstradiooli omaga sarnanevat toimet.

Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

Märkus: dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik

Tase 1 Sortimine ja prioriteedi omistamine olemasoleva teabe põhjal	— füüsikalised ja keemilised omadused, nt molekulmass, reaktsioonivõime, lenduvus, biolagunevus — inimese ja keskkonna kokkupuude, nt tootmismahd, heide keskkonda, kasutusviisid — ohud, nt olemasolevad toksikoloogiaandmed	
Tase 2 <i>In vitro</i> katsed, mis annavad andmeid mehhanismi kohta	— ÖR, AR, TR retseptorile sidumise afiinsus — Transkriptsiooni aktiveerimine — Aromataas ja steroidogenees <i>in vitro</i> — Arüülsüivesinike retseptori äratundmine/sidumine — kvantit. strukt.-aktiivsuse sõltuvused (QSAR)	— Suure jõudlusega sõeluuringud — Kilpnäärmefunktsioon — Kala hepatotsüütide vitellogeniini (VTG) katse — Muud (vastavalt vajadusele)
Tase 3 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid ühe hormooni kohta Mehhanismid ja toimed	— Uterotroofne katse (östrogeenid) — Hershbergeri katse (androgeenid) — Hormooni retseptorisõltumatu toime — Muud (nt kilpnääre)	— Kala VTG (vitellogeniin) katse (östrogeenid)
Tase 4 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid mitme hormooni kohta Mehhanismid ja toimed	— Tõhustatud OECD 407 (näitajad põhinevad endokriinmehhanismidel) — Isas-ja emasloomade puberteedikatsed — Täiskasvanud opereerimata isasloomade katse	— Kala sugunäärmete histopatoloogia katse — Kullese metamorfoosi katse
Tase 5 <i>In vivo</i> katsed, mis annavad andmeid endokriinse jm mehhanismi põhjustatud toime kohta	— 1-põlvkonna-katse (tõhustatud TG415)¹ — 2-põlvkonna-katse (tõhustatud TG416)¹ — reproduktiivsõelumiskatse (tõhustatud TG421)¹ — kombineeritud 28 päeva / reproduktiivsõelumise katse (tõhustatud TG 422)¹ ¹ VMG mamm kaalub võimalikke tõhustamisi	— Osalise ja täiseluringi katsed kalade, lindude, kahepaiksete ja selgrootutega (areng ja paljunemine)

VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE

- Märkus 1: kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.
- Märkus 2: tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.
- Märkus 3: kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendama ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.
- Märkus 4: iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.
- Märkus 5: praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.
- Märkus 6: raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

KIRJANDUS

- 1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- 3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.
- 4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- 5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.
- 6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- 7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp. 111:1530-1549
- 8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp. 111:1550-1558.
- 9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- 10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582–587.
- 11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- 12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerker K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.

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

- 34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1–2): 159–184.
- 35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- 36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- 37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. No. 71.
- 38) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

B.55. HERSHBERGERI BIOKATSE ROTTIDEL: KIIRE SÕELKATSE (ANTI)ANDROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 441 (2009). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja rotiga tehtava Hershbergeri biokatse juhend. Pärast mitme aastakümne pikkust kasutamist ravimitööstuses standarditi see katse kõigepealt ametliku eksperdikomitee poolt 1962. aastal sõelkatsena androgeense toimega kemikaalide väljasegitamiseks (2). Aastatel 2001–2007 läbis rotiga tehtav Hershbergeri biokatse ulatusliku valideerimisprogrammi, mille käigus koostati üksikasjalik taustadokument (23), põhjalik artikkel (3) meetodite kohta, arendati välja lahkamise juhendid (21) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust. Nimetatud uuringud viidi läbi tugeva võrdlusandrogeeniga (testosteroonpropionaat (TP)), kahe tugeva sünteetilise androgeeniga (trenboloonatsetaat ja metüültestosteroon), ühe tugeva antiandrogeense ravimiga (flutamiid), loodusliku androgeeni (dihüdrotestosteroon, DHT) sünteesi tugeva inhibiitoriga (finasteriid), mitme nõrgalt antiandrogeense pestitsiidiga (linuroon, vinklosoliin, protümidoon, p,p'-DDE), tugeva 5 α -reduktaasi inhibiitoriga (finasteriid) ja kahe teadaoleva toimeta (negatiivse) kemikaaliga (dinitrofenool ja nonüülfenool) (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on võetud kokku pikaajaliste biokatsega saadud kogemused ning valideerimisprogrammi käigus saadud kogemused ja saavutatud tulemused.
2. Hershbergeri biokatse on kiire *in vivo* sõelkatse, milles kasutatakse isassuguorganite kudesid. Katse töötati välja 1930. aastatel ja 1940. aastatel seda muudeti, et lisada ka isassuguorganite androgeenitundlikud lihased (2, 9–15). 1960. aastatel hinnati katse-eeskirja standarditud versiooni kasutades enam kui 700 võimalikku androgeeni (2, 14); sel ajal peeti seda katset nii androgeenide kui ka antiandrogeenide määramise standardmeetodiks (2, 15). Praegune biokatse põhineb enne puberteeti kastreeritud isasrottide viie androgeenisõltuva koe massi muutustel. Sellega hinnatakse, kas kemikaal kutsus esile bioloogilisi toimeid, mis on kooskõlas androgeeni agonistide, antagonistide või 5 α -reduktaasi inhibiitorite toimega. Viis androgeenisõltuvat kude, mida hõlmab käesolev katsemeetod, on ventraalne eesnäärme (*ventral prostate*, VP), seemnepõis (*seminal vesicle*, SV) (pluss vedelikud ja koagulatsiooninäärmed), lihas *levator ani-bulbocavernosus* (LABC), paarilised Cowperi näärmed (COW) ja suguti pea (*glans penis*, GP). Enne puberteeti kastreeritud isasrottidel reageerivad kõik need viis kude androgeenide absoluutse massi suurenemisega. Samas kui nende kudede stimuleerimine tugeva võrdlusandrogeeniga suurendab nende massi, väheneb kõigi nende viie koe mass antiandrogeenide toimel. Hershbergeri biokatse esmane mudel oli enne puberteeti kirurgiliselt kastreeritud isasrott; seda mudelit valideeriti Hershbergeri valideerimisprogrammide etappidel 1, 2 ja 3.
3. Biokatset saab kasutada androgeeni agonistide, antagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitorite rutiinseks *in vivo* sõeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” (2. liide) kontekstis. Selles kontseptuaalses raamistikus on Hershbergeri biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekretsioonimehhanismi, nimelt (anti) androgeensuse kohta. Hershbergeri biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale.

4. Kuna loomade kastreerimise operatsioon on küsitav loomade heaolu seisukohast, püüti alternatiivse mudelina hakata kasutama opereerimata (kastreerimata) võõrutamiseas isasrotte, et vältida Hershbergeri biokatses kastreerimisetappi. Võõrutuseas isasloomade katsemeetod valideeriti (24); kuid valideerimisuuringu selgus, et Hershbergeri biokatses võõrutamiseas isasloomade versiooniga ei ole võimalik järjekindlalt avastada nõrkade antiandrogeenide kasutatud kontsentratsioonide mõju androgeenisõltuvate kudede massile. Seetõttu ei hõlma käesolev katsemeetod seda versiooni. Kuna aga selle kasutamine võib olla oluline mitte ainult loomade heaolu seisukohast, vaid võib anda ka teavet muude toimeviiside kohta, on see kättesaadav OECD juhenddokumendis 115 (25).

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Androgeeni agonistid ja antagonistid toimivad androgeenireseptorite ligandidena ja võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. Lisaks takistavad mõned kemikaalid testosterooni muutmist mõjusamaks looduslikuks androgeeniks dihidrotestosterooniks mõnes androgeeni sihtkoos (5 α -reduktaasi inhibiitorid). Sellised kemikaalid võivad põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reproduktiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on regulatiivsetel eesmärkidel vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke androgeeni agoniste või antagonistide või 5 α -reduktaasi inhibiitoreid. Kuigi ligandi afiinsus androgeenireseptori suhtes, mida mõõdetakse retseptorile sidumise või reportergeenide transkriptsiooni aktiveerimise kaudu *in vitro*, annab küll olulist teavet, ei ole see siiski mitte ainus võimalik ohtu põhjustav tegur. Muud tegurid hõlmavad metabolismi aktiveerimist ja inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, kemikaalide jaotumist sihtkudedesse ja väljutamist kehast. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku mõju *in vivo* asjakohastes tingimustes ja asjakohase kokkupuute korral. *In vivo* hindamine on vähem oluline, kui kemikaali sellised omadused, mis on seotud neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega, on teada. Androgeenisõltuvad koed reageerivad androgeeniga stimuleerimisele kiire ja jõulise kasvuga, eriti enne puberteeti kastreeritud isasrottide puhul. Närlisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast sobib biokatses käesolev versioon, milles kasutatakse enne puberteeti kastreeritud rotte ja viit sihtkude, androgeeni agonistide, antagonistide või 5 α -reduktaasi inhibiitorite *in vivo* sõelkatseks.
6. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuuringu kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutasid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisistes kui ka laboritevahelistes uuringutes (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on esitatud nii androgeeni kui ka antiandrogeeni määramise meetod.
7. Kuigi testosteroonpropionaadi (TP) doos, mida kasutati antiandrogeenide määramiseks OECD Hershbergeri biokatses valideerimisprogrammis, oli eri laborites erinev (0,2 ja 0,4 mg/kg/päevas, nahaalune süst), ei olnud nende kahe katse-eeskirja versioonide vahel suuri erinevusi nõrga või tugeva antiandrogeense aktiivsuse tuvastamises. Siiski on selge, et TP doos ei tohiks olla liiga kõrge, et takistada nõrkade androgeenireseptori (AR) antagonistide mõju, ega liiga madal, nii et androgeenitundlike kudede kasv on liiga väike isegi ilma antiandrogeeni samaaegse manustamiseta.
8. Üksikute androgeenitundlike kudede reaktsioon ei ole siiski täielikult tingitud androgeenist, st ka muud kemikaalid kui androgeeni antagonistid võivad muuta teatavate kudede massi. Mitme koe samaaegne kasv siiski tõendab androgeenispetsiifilist mehhanismi. Näiteks tugevad östrogeenid suures doosis võivad suurendada seemnepõiekestes massi; muud androgeenisõltuvad koed ei reageeri aga sarnasel viisil. Antiandrogeense toimega kemikaalid võivad toimida kas androgeenireseptori antagonistidena või 5 α -reduktaasi inhibiitoritena. 5 α -reduktaasi inhibiitorid on mitmesuguse mõjuga, kuna muundamine tugevama toimega dihidrotestosterooniks on eri kudedes erinev. Antiandrogeenidel, nagu finasteriid, mis inhibeerivad 5 α -reduktaasi, on suurem mõju ventraalses eesnäärmes kui muudes kudedes, kui võrrelda sellise androgeenireseptori tugeva antagonistiga nagu flutamiid. Seda erinevust kudede reaktsioonis võib kasutada androgeenireseptorist sõltuva ja 5 α -reduktaasist sõltuva toime eristamiseks. Lisaks sellele on androgeenireseptor evolutsiooniliselt suguluses muude steroidhormoonide retseptoritega, ja kui mõnda muud hormooni manustatakse suures, füsioloogilist taset kaugelt ületavas doosis, võib see siduda end retseptoriga ja toimida testosteroonpropionaadi põhjustatava kasvu stimuleerimise antagonistina (13). Lisaks on ka usutav, et tõhustatud steroidide metabolism ja sellest tingitud seerumi testosteroonisalduse vähenemine võib vähendada androgeenisõltuvate kudede kasvu. Seepärast tuleb Hershbergeri biokatses positiivse tulemuse hindamisel tavaliselt lähtuda sellest, kui kaalukad on tõendid, sealhulgas *in vitro* katsed, nagu androgeenireseptori ja östrogeenireseptori sidumise katsed ja vastavad transkriptsiooni aktiveerimise katsed või muud *in vivo* katsed, millega uuritakse sarnaseid androgeeni sihtkudesid, nagu isaslooma puberteedikatses, 15-päevane opereerimata täiskasvanud isaslooma katse või 28-päevane või 90-päevane korduvdoosi uuring.

9. Kogemused näitavad, et ksenobiootilisi androgeene esineb harvemini kui ksenobiootilisi antiandrogeene. Seepärast eeldatakse, et Hershbergeri biokatset kasutatakse kõige sagedamini antiandrogeenide leidmise sõelkatsena. Androgeenide tuvastamise katset võib sellele vaatamata siiski soovitada steroidsete või steroidisarnaste kemikaalide või selliste kemikaalide puhul, mille võimaliku androgeense mõju kohta on saadud viiteid meetoditega, mis on kontseptuaalse raamistiku (2. liide) 1. või 2. tasemel. Sarnaselt sellega võib (anti)androgeense profiiliga seotud kahjulikke mõjusid leida 5. taseme uuringutega, mistõttu tuleb hinnata, kas kemikaal toimib endokriinse mehhanismi kaudu.
10. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomade hooldamise kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (17).
11. Nagu iga biokatse puhul, milles kasutatakse katseloomi, tuleb hoolikalt kaaluda, kas uuringut on üldse vaja teha. Sellise otsuse tegemiseks võib põhimõtteliselt olla kaks põhjust:
 - suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase) või kaudsed andmed kemikaali (anti)androgeensuse kohta *in vitro* katsetest (2. tase), mille tõttu on vaja täiendavalt uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;
 - (anti)androgeensusele osutav mõju 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja on vaja täiendavaid uuringuid konkreetse toimeviisi selgitamiseks, näiteks tõendamiseks, et mõju aluseks on (anti)androgeenne mehhanism.
12. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

13. Hershbergeri biokatse on tundlik, kuna selles kasutatakse isasloomi, kelle endogeense androgeeni nõristumine on minimaalne. See saavutatakse kastreeritud isasloomade kasutamisega tingimusel, et pärast kastreerimist on möödunud piisavalt aega ning sihtkoed on taandarenenud miinimumini ja arvestatakse ühesugust nulljoonele vastavat massi. Seega on võimaliku androgeense toime avastamise sõeluuringu tegemisel veres ringleva endogeense androgeeni sisaldus madal, hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg ei suuda seda tagasisidemehhanismide kaudu kompenseerida, kudede võime androgeenile reageerida on viidud maksimumini ja lähtekoe mass miinimumini. Võimalike antiandrogeenide otsimisel võib saavutada kooskõllalisema kudede massi suurenemise, kui kudesid stimuleeritakse võrdlusandrogeeniga. Selle tulemusel on Hershbergeri biokatses vaja ainult 6 looma doosirühma kohta, samal ajal kui muudes katsetes opereerimata puberteedialiste või täiskasvanud isasloomadega soovitatakse kasutada 15 isaslooma igas doosirühmas.
14. Isasrottide puberteedilähedane kastreerimine peaks toimuma asjakohasel viisil, heakskiidetud anesteetikumide ja aseptilise tehnika kasutamisega. Esimese paari päeva jooksul pärast operatsiooni tuleks manustada valuvaigisteid, et kõrvaldada operatsioonijärgseid vaevusi. Kastreerimine suurendab katsemeetodi täpsust nõrkade androgeenide ja antiandrogeenide avastamisel, kuna kõrvaldab kompenseerivad sisesekretsioonisüsteemi tagasisidemehhanismid, mis on olemas opereerimata katseloomas ja mis võivad nõrgendada manustatavate androgeenide ja antiandrogeenide mõju, ning kõrvaldab samuti eri isasrottide testosteroonitaseme suured erinevused seerumis. Seega vähendab kastreerimine loomade arvu, mida on vaja endokriinse mõju tuvastamiseks sõeluuringuga.
15. Sõeluuringuga võimaliku androgeense toime leidmiseks manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondiga või nahaaluse süstiga kümnel järjestikusel päeval. Uuritavat kemikaali manustatakse vähemalt kahe doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline suurenemine uuritavat kemikaali saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse kandeainet, näitab, et uuritav aine on võimaliku androgeense toime suhtes positiivne (vt punkt 60). Sellised androgeenid nagu trenboloon, mida ei ole võimalik 5α — taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le (*levator ani-bulbocavernosus*) ja GP-le (*glans penis*) kui testosteroonpropionaat, kuid kõigi kudede juures peaks näha olema intensiivsemat kasvu.
16. Võimaliku antiandrogeense aktiivsuse otsimisel sõelkatsetega manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondi või naha alla süstimisega kümnel järjestikusel päeval koos testosteroonpropionadi igapäevase manustamisega (0,2 või 0,4 mg/kg/päevas) nahaluste süstide abil. Valideerimisprogrammiga tehti kindlaks, et võib kasutada

kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas, kuna mõlema doosiga sai avastada antiandrogeene ja sellepärast tuleks katses kasutamiseks valida ainult üks nendest doosidest. Erinevaid uuritava kemikaali doose manustatakse vähemalt kolme doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline vähenemine uuritavat kemikaali ja testosteroonpropionaati saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse ainult testosteroonpropionaati, näitab, et uuritav aine on võimaliku antiandrogeense toime suhtes positiivne (vt punkt 61).

MEETODI KIRJELDUS

Liikide ja liinide valimine

17. Hershbergeri biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte. Kuigi bioloogiliselt on võimalik, et roti ja hiire reaktsioon võib olla sarnane, on roti 70-aastase kasutamise põhjal kujunenud rott Hershbergeri biokatses eelistatud loomaliigiks. Lisaks sellele, kuna Hershbergeri biokatse tulemus võib olla pikema, mitut põlvkonda hõlmava uuringu eelkatse, võimaldab see kasutada mõlemas uuringus sama liigi ja liini ning samast allikast pärinevaid loomi.
18. Käesoleva katse-eeskirja kohaselt lubatakse laboril valida katses kasutamiseks sellise liini rott, keda osalevas laboris on varem tavaliselt kasutatud. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate rotiliinide loomi, kuid siiski ei tuleks kasutada liine, mille isasloomad küpsevad oluliselt hiljem kui 42 päeva vanuselt, kuna nende loomade kastreerimine 42. päeval võib takistada suguti pea massi määramist, mida saab teha alles pärast seda, kui eesnahk on eraldunud peenise tüve küljest. Seega ei tuleks kasutada liine, mis pärinevad Fisher 344 rottidest, või teha seda üksnes harvadel juhtudel. Fisher 344 rottidel on seksuaalse küpsemise ajastus teistsugune kui sagedamini kasutatavatel Sprague Dawley või Wistari liini rotid (16). Kui tuleb kasutada sellist liini, tuleks need kastreerida veidi kõrgemas vanuses ja labor peab suutma näidata, et kasutatav liin on tundlik. Labor peaks selgelt põhjendama, miks valiti konkreetse liini rotid. Kui sõeluuring võib olla korduva suukaudse doosi, reproduktiivtoksilisuse, arenguhäireid põhjustava toksilisuse või pikaajalise toksilisuse uuringu eelkatse, tuleks kõigis uuringutes eelistatavalt kasutada samast liinist ja samalt tarnijalt saadud loomi.

Pidamis- ja söötmistingimused

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kõikidele kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning rangemad kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ± 3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt ei peaks olema üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.
20. Rühmas pidamine on eelistatav isoleerimisele, arvestades loomade noorust ja asjaolu, et rotid on seltsingulised loomad. Kahe või kolme looma paigutamine puuri võimaldab vältida liigset asustustihedust ja sellega seotud stressi, mis võib mõjutada paljunemisfunktsiooniga seotud kudede arengut. Puurid tuleb hoolikalt puhastada võimalikest saasteainetest; puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Sobiva suurusega puuris (ca. 2 000 ruutsentimeetrit) ei ole loomad liiga tihedalt.
21. Iga loom peab olema humaansel viisil eraldi märgistatud (nt kõrvamärk või lipik). Kasutatud märgistamismeetod tuleks kirjeldada.
22. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Hershbergeri biokatset tegev labor peaks kasutama tavalist sööta, mida tavaliselt kasutatakse kemikaalide katsetamise uuringute puhul. Biokatse valideerimisuuringus ei täheldatud mõju või varieeruvust, mille põhjuseks oleks tulnud pidada sööta. Kasutatud sööt tuleks kirjeldada ja laborisööda proov tuleks säilitada võimaliku tulevase analüüsi jaoks.

Androgeenisõltuvate organite masside kasutatavuse kriteeriumid

23. Valideerimisuuringu ajal ei saadud tõendeid, et kehamassi vähenemine oleks mõjutanud sihtkudede (st käesolevas uuringus kaalutavate kudede) massi suurenemist või vähenemist.

24. Valideerimisprogrammis edukalt kasutatud eri liinide hulgas on androgeenisõltuvate organite mass suurema kehamassiga rotiliinide puhul suurem kui väiksema kehamassiga rottidel. Hershbergeri biotesti kehtivuse kriteeriumid ei hõlma seega elundite oodatavat absoluutset massi positiivsetes (doosi)rühmades ja negatiivsetes kontrollrühmades.
25. Kuna koe puhul on variatsioonikordaja (CV) pöördvõrdeline statistilise võimsusega, siis Hershbergeri biokatse kasutatavuse kriteeriumid põhinevad iga koe puhul lubataval maksimaalsel CV väärtusel (tabel 1). CV väärtused tulenevad OECD valideerimisuuringutest. Negatiivse tulemuse korral peaks labor uurima kontrollrühma ja suure doosiga rühma CV-sid ja tegema kindlaks, kas kasutatavuse jaoks lubatava maksimaalse CV kriteerium on ületatud.
26. Uuringut tuleks korrata, kui: 1) kontrollrühma ja suure doosi rühmade kümnest võimalikust eraldi CV-st on kolm või enam suuremad agonisti ja antagonist uuringute jaoks esitatud väärtustest tabelis 1 ning 2) vähemalt kaks sihtkude olid marginaalselt ebaolulised, st p väärtused on vahemikus 0,05–0,10.

Tabel 1

Maksimaalsed lubatavad CVD, mis on kastreeritud mudelis määratud paljunemiskriteeriumiga seotud sihtkudedele jaoks OECD valideerimisuuringus ⁽¹⁾

Kude	Antiandrogeensed mõjud	Androgeensed mõjud
Seemnepõiekesed	40 %	40 %
Ventraalne eesnäär	40 %	45 %
Levator ani-bulbocavernosus	20 %	30 %
Cowperi näärmed	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

KATSE KORRALDUS

Õigusnormidele vastavus ja labori valideerimine

27. Erinevalt uterotroofsest katsest (käesoleva lisa peatükk B.54) ei ole Hershbergeri katse puhul enne katse alustamist vaja tõendada labori pädevust, kuna paralleelselt tehakse positiivset kontrollkatset (testosteroonpropionaat ja flutamiid) ja negatiivset kontrollkatset, mis on katse lahutamatud osad.

Loomade arv ja seisund

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma. See kehtib nii androgeense kui ka antiandrogeense katse-eeskirja kohta.

Kastreerimine

29. Pärast loomade saamist peaks olema esialgne kohanemisperiood mitu päeva, et veenduda, et loomad on hea tervise juures ja tunnevad end hästi. Kuna enne 42 päeva vanuseks saamist (PND 42) kastreeritud loomadel ei tarvitse eesnahk eralduda, tuleks loomad kastreerida 42. päeval või hiljem, mitte varem. Loomad kastreeritakse narkoosi all; munandikotti tehakse sisselõige, kõrvaldatakse mõlemad munandid ja munandimanused ning vere-sooned ja seemnejuhad ligeeritakse. Kui on kindlaks tehtud, et verejooksu ei ole, tuleks munandikott sulgeda õmbluse või klambritega. Loomadele tuleks esimestel päevadel pärast operatsiooni anda valuvaigistit, et leevendada operatsioonijärgseid ebamugavusi. Kui loomade tarnijalt ostetakse kastreeritud loomad, teatab tarnija loomade vanuse ja seksuaalse küpsuse staadiumi.

⁽¹⁾ CV künnisväärtus teatava koe jaoks määrati CV väärtuste graafikult, millele olid kantud kõikide valideerimisuuringute konkreetse mudeliga (agonist või antagonist) leitud keskvaartuste CV-d järjestatuna väikseimast suurimani. CV künnisväärtuseks loeti punkt, mille juures CV-väärtuste suurenemised järgmiste kõrgemate CV-de suunas muutusid järsult suuremaks kui mõne eelneva CV vahel — see loeti murdepunktiks. Tuleks märkida, et kuigi selle analüüsiga leiti suhteliselt usaldusväärsed murdepunktid katse antagonistide mudeli puhul, olid agonistide mudeli CV kõverad ühtlasemate suurenemistega väärtuste vahel, mistõttu künnisväärtuse CV leidmine selle meetodiga oli mõnevõrra meelevaldne.

Kohanemine pärast kastreerimist

30. Loomadel tuleks lasta jätkata kohanemist laboritingimustega vähemalt 7 päeva pärast kastreerimist, et sihtkoed saaksid taandareneda (nende mass väheneb). Loomi tuleb iga päev jälgida ja kõik haiguse või kehaliste kõrvalekallete märkidega loomad tuleks kõrvaldada. Dooside manustamist uuringu tegemiseks saab alustada kõige varem seega 49. päeval pärast sündimist (PND 49), seda ei tohiks alustada hiljem kui päeval PND 60. Vanus lahkamise ajal ei tohiks olla suurem kui PND 70. Selline paindlikkus lubab laboril oma katseid tõhusalt planeerida.

Kehamass ja juhuvaliku alusel rühmadesse jagamine

31. Loomade kehamassi erinevused põhjustavad keha kudede massi varieeruvust nii rühma sees kui ka rühmade vahel. Suurem koemasside varieeruvus suurendab variatsioonikordajat (CV) ja vähendab katse statistilist võimsust (mida nimetatakse mõnikord katse tundlikkuseks). Seepärast tuleks kehamassi varieeruvust hoida nii eksperimentaalselt kui ka statistiliselt kontrolli all.
32. Eksperimentaalne kontrolli all hoidmine hõlmab kehamassi varieeruvuse võimalikult väiksena hoidmist nii katserühma piires kui ka rühmade vahel. Kõigepealt tuleks vältida ebatavaliselt väikseid või suuri loomi ja neid ei tuleks võtta uuritavate loomade hulka. Katse alguses ei tohiks loomade kehamassi varieeruvus olla suurem kui ± 20 % keskmisest kehamassist (nt $175 \text{ g} \pm 35 \text{ g}$ kastreeritud puberteetilähedases vanuses rottide puhul). Teiseks, loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Kasutatud randomiseerimismeetodit tuleb kirjeldada.
33. Kuna kemikaali mürgisus võib vähendada kehamassi doosirühmades, võrreldes kontrollrühmaga, võiks statistilise kaasmuutujana kasutada kehamassi uuritava kemikaali manustamise esimesel päeval, mitte kehamassi lahkamise ajal.

Dooside manustamine

34. Selleks et teha kindlaks, kas uuritaval kemikaalil võib *in vivo* olla androgeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ning positiivsest kontrollrühmast ja kandeaine (negatiivsest) kontrollrühmast (vt punkt 43); seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale androgeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Antiandrogeense toime uurimiseks manustatakse uuritavat kemikaali koos võrdluseks kasutatava androgeeniagonistiga. Tuleks kasutada vähemalt kolme uuritava kemikaali erineva doosiga katserühma (doosirühmad) ning positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli rühma (vt punkt 44). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui doosirühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleb kontrollrühmale manustada kandeainet suurimas doosirühmade puhul kasutatud mahus.
35. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Suurima doosi puhul tuleb kõigepealt arvesse võtta LD_{50} väärtust ja/või teavet ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi või ebamugavusi (17, 18, 19, 20), ja teiseks olemasolevat teavet dooside kohta, mida on kasutatud subkroonilise ja kroonilise toksilisuse uuringutes. Üldiselt ei tohiks suurim doos põhjustada kehamassi vähenemist katse lõpuks mitte rohkem kui 10 % kontrollrühma loomade massist. Suurim doos peaks olema kas: 1) suurim doos, mis tagab loomade ellujäämise ja mis ei põhjusta erilist mürgistust või kannatusi loomadele pärast manustamist 10 järjestikusel päeval doosis kuni $1\,000 \text{ mg/kg/päevas}$ (vt punkt 36) või 2) doos, mis põhjustab (anti)androgeenset toimet, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kuna see on sõelkatse, siis võib kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse (vt punkt 37).

Piirdoosi tase

36. Kui katse piirdoosiga $1\,000 \text{ mg/kg/päevas}$ ja väiksema doosiga vastavalt käesolevas eeskirjas kirjeldatud korrale ei tekita statistiliselt olulist muutust reproduktiivorganite massis, võib täiendavaid doositasemeid pidada mittevajalikuks. Sellist piirdoosi väärtust kasutatakse alati, välja arvatud sellised juhud, kui inimese kokkupuute andmed viitavad vajadusele kasutada kõrgemat doositaset.

Vahemiku leidmise kaalutlused

37. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosivahemiku leidmiseks, et valida sobivad doosirühmad (kasutades ägeda mürgisuse tuvastamise katseid (käesoleva lisa peatükid B.1b, B.1c (27), OECD katse-eeskiri 425 (19))). Hershbergeri biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise, ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kümnel järjestikusel päeval piirdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas, nagu on märgitud punktides 35 ja 36. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti (17), milles on määratletud mürgistusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib koed pärast 10-päevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võib seejärel kasutada põhiuurimuses kasutatavate dooside valimise hõlbustamiseks.

Võrdluskemikaalid ja kandeaine

38. Võrdluseks kasutatav androgeeniagonist peaks olema testosteroonpropionaat (TP), CASi nr 57-82-5. Võrdlus-TP doos võib olla kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas. Võrdluseks kasutatav androgeeniantagonist peaks olema flutamiid (FT), CASi nr 1311-84-7. Võrdlus-FT doos peaks olema 3 mg/kg/päevas ja FT tuleks manustada koos võrdlus-TP doosiga.
39. Soovitav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna paljud androgeensed ligandid või nende metaboolsed eellased on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökontsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peaksid olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealikvoodi ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused, olles hoolikas, et vältida proovide saastumist või rikkumist.

Dooside manustamine

40. TP-d tuleks manustada nahaaluse süstiga ja FT-d suukaudse sondiga.
41. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudse sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaoluga seotud kaalutlusi ning uuritava kemikaali füüsikalisi ja keemilisi omadusi. Lisaks tuleb arvestada toksikoloogilisi aspekte, nagu kokkupuuteviisi asjakohasus inimese kemikaaliga kokkupuute seisukohast (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid — sissehingamisele või imendumisele naha kaudu), ning olemasolevaid toksikoloogilist teavet ja andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral), enne kui süstimise teel saadud positiivse tulemuse põhjal algatatakse ulatuslik pikaajaline uuring.
42. Loomadele tuleks doose manustada samal viisil ja sama ajakava kohaselt 10 järjestikusel päeval umbes 24-tunniste vaheaegadega. Doosi suurust tuleks kohandada iga päev, arvestades igapäevaseid kehamassi määramise andmeid. Igal doosi manustamise päeval tuleks kirja panna doosi maht ja manustamise kellaaeg. Tuleb jälgida, et ei ületataks maksimaalset doosi, mida on kirjeldatud punktis 35, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid. Tuleks kasutada suukaudset sondi, maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Vedeliku suurim kogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, kus võib kasutada mahtu kuni 10 ml kehamassi kg kohta. Nahaaluse süstiga manustamisel tuleks doose manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõelaga (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljajumbumine või doosi mittetäielik manustamine. Päevas rotile süstitav vedelikukogus ei tohiks ületada 0,5 ml kehamassi kg kohta.

Androgeeniagonistide katsete tegemise meetodid

43. Androgeeniagonistide katsetes on kandeaine negatiivne kontroll ja TP-d saav rühm on positiivse kontrolli rühm. Androgeeniagonistile omast bioloogilist toimet kontrollitakse uuritava kemikaali manustamisega katserühmadele valitud doosis 10 järjestikuse päeva jooksul. Kemikaali saanud katserühma loomade paljunemisfunktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse kandainet saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi suurenemine.

Androgeeniantagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitorite katsete tegemise meetodid

44. Androgeeniantagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitorite katsetes on TP-d saav rühm negatiivne kontroll ja rühm, mille loomadele manustatakse korraga TP-d ja FT-d, on positiivne kontroll. Androgeeniantagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitoritega seotud bioloogilist toimet kontrollitakse TP võrdlusdoosi ja uuritava kemikaali manustamisega 10 järjestikuse päeva jooksul. TP-d ja kemikaali saanud katserühma loomade paljunemisfunktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse ainult TP-d saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi vähenemine.

VAATLUSED**Kliinilised vaatlused**

45. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul tuleks jälgida suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).
46. Surnuna leitud loomad tuleks kõrvaldada ning hävitada ilma täiendava andmete analüüsita. Iga looma surm enne lahanguks tuleks kanda katseprotokolli koos surma võimalike põhjustega. Kõik suremas olevad loomad tuleks humaanselt surmata. Iga suremas olnud ja hiljem eutanaasia teel surmatud loom tuleks kanda katseprotokolli ja esitada haiguse võimalikud põhjused.

Kehamass ja sööda tarbimine

47. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmissaadmete kaalumiseega. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

Lahkamine ning kudede ja organite massi mõõtmine

48. Ligikaudu 24 tundi pärast uuritava kemikaali viimase doosi manustamist tuleks rotid humaanselt surmata ja lasta verest tühjaks joosta vastavalt katset tegeva labori tavalisele korrale ning teha lahkamine. Humaanse surmamise meetod tuleks esitada katseprotokollis.
49. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamine teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid mõjutada. Kõik lahkamise tähelepanekud, nagu patoloogilised muutused või nähtavad kahjustused, tuleks üles märkida ja esitada protokollis.
50. Viis androgeenisõltuvat kude (VP, SV, LABC, COW, GP) tuleks kaaluda. Need koed tuleks välja lõigata, hoolikalt vabastada liigsetest nende külge kinnitunud kudedest ja rasvast ning määrata nende värske (fikseerimata) mass. Iga kude tuleks käidelda eriti hoolikalt, et vältida vedelike kaotust ja kuivamist, mis võib põhjustada suuri vigu ja varieeruvust, kuna väheneb registreeritav mass. Mitmed koed võivad olla väga väikesed või raskesti välja lõigatavad

ja see tekitab varieeruvust. Seepärast on oluline, et paljunemiskontrolliga seotud kudede eraldamist sooritav isik tunneks nende kudede eraldamise tavalist korda. Standardse töökorra (SOP) käsiraamatu saab OECD-lt (21). Uuringu tulemuste võimalikku varieeruvust saab vähendada SOP juhendialase hoolika koolitusega. Ideaaljuhul peaks teatava konkreetse koe eraldamisi tegema sama isik, et vähendada isikutevahelisi erinevusi kudede töötlemisel. Kui see ei ole võimalik, peaks lahkamine olema korraldatud nii, et iga lahkaja eraldab teatavat kude kõigi katserühmade loomadelt, mitte nii, et üks isik eraldab kõik koed kontrollrühma loomadelt ja teine isik doosirühmade loomadelt. Iga paljunemiskontrolliga kude tuleks ilma kuivaks pühkimata kaaluda 0,1 mg täpsusega ja iga looma kudede massid tuleb registreerida.

51. Mitmed koed võivad olla väga väiksed või raskesti välja lõigatavad ja see tekitab varieeruvust. Varasema tööga on leitud variatsioonikordajate (CV) vahemik, mis näib olevat erinev ja näib sõltuvat labori pädevuse tasemest. Mõnel juhul on täheldatud kudede, nagu VP ja COW, absoluutmasside suuri erinevusi samas konkreetsetes laboris.
52. Soovi korral võib määrata ka maksa massi, mõlema neeru massi (koos) ja mõlemate neerupealiste massi (koos). Koed tuleks ka sel puhul vabastada nendega ühendatud sidekirmetest ja rasvast. Maks tuleks kaaluda täpsusega 0,1 g, mõlemad neerud ja mõlemad neerupealised — täpsusega 0,1 mg ning need andmed registreerida. Maksa, neerusid ja neerupealisi ei mõjuta mitte üksnes androgeenid; need elundid annavad kasulikku teavet ka süsteemse mürgisuse kohta.
53. Soovi korral võib mõõta luteiniseeriva hormooni (LH), folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja testosterooni (T) sisalduse seerumis. Testosteroonisisaldust seerumis on kasulik määrata siis, kui uuritav kemikaal põhjustab testosterooni metabolismi maksas ja vähendab seerumi testosteroonisisaldust. Kui selliseid T andmeid ei ole, võib näida, et mõju avaldub antiandrogeense mehhanismi kaudu. LH tase annab teavet antiandrogeeni omaduse kohta mitte ainult vähendades elundite massi, vaid mõjutada ka hüpotalamuse-ajuripatsi funktsiooni, mis pikaajalises katses võib tekitada munandikasvajaid. FSH on oluline hormoon spermatogeneesi jaoks. Võib määrata ka seerumi T4 ja T3 sisalduse; see võib anda kasulikku lisateavet kemikaali võime kohta häirida kilpnäärme homöostaasi. Kui tehakse hormoonide mõõtmisi, tuleks rotid enne lahkamist tuimastada ja võtta neilt veri südame punktsiooniga; narkoosimeetod tuleks valida hoolikalt, et mitte mõjutada hormoonitaseme mõõtmisi. Seerumi valmistamise meetod, radioimmuunanalüüsi- või muude mõõtmiskomplektide päritolu ja tulemused tuleks registreerida. LH ja T sisaldus esitatakse ng-des seerumi ml kohta.
54. Kudede eraldamisel tuleb tugineda üksikasjalikele fotodega lahkamisjuhenditele, mis on avaldatud valideerimisprogrammi osana kui lisamaterjal (21). Korea toidu- ja ravimiameti veebisaidil on kättesaadav ka lahkamist käsitlev video (22).
 - Looma keha pannakse lauale kõhuga ülespoole ja tehakse kindlaks, kas suguti eesnahk on eraldunud suguti peast. Kui see on nii, tõmmatakse eesnahk tagasi, eemaldatakse suguti pea ja kaalutakse see 0,1 mg täpsusega; mass registreeritakse.
 - Avatakse kõhunahk ja kõhuõõne sein, paljastatakse siseelundid. Kui tuleb määrata soovi korral määratavate elundite mass, eemaldatakse ja kaalutakse maks täpsusega 0,1 g, eemaldatakse magu ja soolestik, eemaldatakse ja kaalutakse neerud (koos) ja neerupealised (koos) täpsusega 0,1 mg. Sellise lahkamisega paljastatakse kusepõis ja jõutakse isaslooma paljunemiskontrolliga seotud kudede eraldamiseni.
 - Ventraalse eesnäärme eraldamiseks eraldatakse kusepõis kõhulihaste kihist, milleks lõigatakse läbi sidekude piki keskjoont. Kusepõis nihutatakse ettepoole seemnepõiekestest suunas, millega paljastatakse ventraalse eesnäärme (*ventral prostate*, VP) vasak ja parem sagar (mida katab rasvakiht). Rasv pühitakse ettevaatlikult VP vasakult ja paremalt sagaralt. VP parem sagar tõstetakse kusetilt ja eraldatakse sagar kusitist. Hoides VP paremat sagarat, tõstetakse VP vasak sagar kusetilt ja eraldatakse; kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.
 - Seemnepõiekestest ja koagulatsiooninäärmete (*seminal vesicles plus coagulating glands*, SVCG) eraldamiseks lükatatakse põis saba poole, millega paljastatakse seemnejuhad ning SVCG parem ja vasak sagar. Vedeliku lekke ärahoidmiseks pannakse verejooksu sulgemise klamber SVCG lähtekohale, kus seemnejuha ühineb kusetiga. SVCGD eraldatakse ettevaatlikult, hoides klambrit oma kohal, lõigatakse ära rasv ja manused, pannakse teadaoleva massiga kaalumiskõõs, eemaldatakse klamber, kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja registreeritakse mass.

- Selleks et eraldada *levator ani* ja *bulbocavernosus* (LABC) lihased, paljastatakse suguti alus ja lihased. LA lihased ümbritsevad käärsoolt, samal ajal kui eesmised LA ja BC lihased on kinnitunud suguti sibulale. Perianaalse piirkonna nahk ja manused, mis ulatuvad peenise lähtekohast kuni pära eesmise otsani, eemaldatakse. BC lihased eraldatakse järk-järgult suguti sibulast ja kudedest. Käärsool lõigatakse pooleks ja nüüd saab eraldada ja kõrvaldada kogu LABC. LABC tuleks puhastada rasvast ja manustest, kaaluda 0,1 mg täpsusega ja registreerida mass.
 - Kui LABC on eemaldatud, tulevad nähtavale ümmargused Cowperi või bulbouretraalnäärmed (COW) suguti sibula lähtekoha juures, veidi selja poole. Lõigata tuleb hoolikalt, et vältida õhukese kesta läbitorkamist ja vedeliku väljavoolu. COW (koos) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.
 - Lisaks, kui lahkamise või kudede eraldamise ajal voolas mõnest näärmest vedelikku välja, tuleks see registreerida.
55. Kui ühe kemikaali hindamiseks on vaja lahata rohkem loomi, kui ühe päevaga on võimalik lahata, võib uuringu alguse jaotada kahele järjestikusele päevale, millega ka lahkamine ja sellega seotud tööd jaotuvad kahele päevale. Kui töö jaotatakse niimoodi järkudesse, tuleks ühel päeval kasutada pooled iga doosirühma loomadest.
56. Kehad tuleks pärast lahangu kõrvaldada sobival viisil.

PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

57. Andmed tuleks esitada eraldi iga looma kohta (kehamass, paljunemisfunktsiooniga seotud kudede mass, soovi korral tehtud täiendavad mõõtmised, muud toimed ja tähelepanekud) ja iga loomarühma kohta (arvutatakse kõikide mõõtmistulemuste keskvärtused ja standardhälbed). Andmed tuleb koondada tabelisse. Tuleks esitada loomade arv katse alguses, katse käigus surnult või mürgistuse tunnustega leitud loomade arv, täheldatud toksilisuse tunnuste kirjeldus, sealhulgas tunnuste ilmumise aeg, tunnuste kestus ja raskus.
58. Lõpp-protokollis tuleks esitada järgmine.

Uurimislabor:

- nimi ja asukoht;
- uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;
- uuringu alguse ja lõpetamise kuupäev, st uuritava kemikaali manustamise esimene päev ja viimane lahkamispäev.

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, nimetus, puhtus, tarnija täielik aadress ja uuritava kemikaali täielik iseloomustus;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalised-keemilised omadused;
- lahjenduste valmistamise meetod, sagedus ja lahuste hoiutingimused;
- kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;
- kõik manustamislahuste või -suspensioonide analüüsid.

Kandeaine:

- kandeaine iseloomustus (nimetus, tarnija ja partii nr);
- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad ja nende pidamise tingimused:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- päritolu või tarnija, kaasa arvatud täielik aadress;
- tarnitud loomade arv ja vanus;

- pidamistingimused (temperatuur, valgustus jne);
- sööt (nimetus, tüüp, tarnija, partii number, koostis ja, kui on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);
- allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);
- puuridesse paigutamise tingimused ja loomade arv puuris.

Katse tingimused:

- vanus kastreerimise ajal ja kohanemise kestus pärast kastreerimist;
- iga looma mass katse alguses (täpsusega 0,1 g);
- kasutatud randomiseerimismeetod ning kandeaine rühma, võrdlusrühma, uuritava kemikaali rühmadesse ja puuridesse määramise andmed;
- iga rühma loomade kehamassi keskvärtus ja standardhälve igal kaalumispäeval kogu uuringu kestel;
- doosi valimise põhjendused;
- uuritava kemikaali manustamise tee ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;
- antiandrogeensuse katse tegemisel TP manustamine (doos ja maht);
- uuritava kemikaali manustamine (doos ja maht),
- manustamise aeg;
- lahkamise kord, sealhulgas veretustamise vahendid ja kasutatud anesteetikumid;
- seerumianalüüside tegemise korral tuleks esitada meetodi üksikasjad. Näiteks, kui kasutatakse radioimmuunanalüüsi (RIA), tuleks esitada järgmine: RIA tegemise kord, RIA komplektide tootja, RIA komplektide aegumise kuupäev, sädearvestuse kord ja standardimine.

Tulemused

- Igapäevased tähelepanekud iga looma kohta dooside manustamise ajal, sealhulgas:
- kehamass (täpsusega 0,1 g);
- kliinilised tunnused (kui neid esineb);
- kõik andmed ja tähelepanekud sööda tarbimise kohta.
- Lahkamise ajal tehtud tähelepanekud iga looma kohta, sealhulgas:
- lahkamise kuupäev;
- doosirühm;
- looma identifitseerimisnumber;
- lahkaja;
- lahangu ja kudede eraldamise kellaaeg;
- looma vanus;
- lõplik kehamass lahkamise ajal; märkida iga statistiliselt oluline suurenemine või vähenemine;
- loomade veretustamise ja lahkamise järjekord;
- viie androgeenisõltuva sihtkoe mass;
- ventraalne eesnääre (täpsusega 0,1 mg);
- seemnepõiekesed ja koagulatsiooninäärmed, koos vedelikuga (koos, täpsusega 0,1 mg);
- *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste kompleks (täpsusega 0,1 mg);
- Cowperi näärmed (märgkaal, koos, täpsusega 0,1 mg);
- peenise pea (märgkaal täpsusega 0,1 mg);

- soovi korral määratavate kudede kaal, kui määrati:
- maks (täpsusega 0,1 g);
- neerud (koos, täpsusega 0,1 mg);
- neerupealised (koos, täpsusega 0,1 mg);
- Üldised märkused ja kommentaarid
- Seerumihormoonide analüüsid, kui need tehti:
 - seerumi luteiniseeriv hormoon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s) ja
 - seerumi testosteroon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s).
- Üldised märkused ja kommentaarid

Andmete kokkuvõte

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, milles näidatakse valimi suurus iga rühma puhul, keskvärtus ja selle standardviga või standardhälve. Tabelites tuleks esitada surmajärgne kehamass, kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni, paljunemisfunktsiooniga seotud kudede mass ja soovi korral määratud muude elundite mass.

Tulemuste arutelu

Tulemuste analüüs

59. Lahkamise ajal määratud kehamassi ja organite massi tuleks statistiliselt analüüsida ja leida näitajad nagu dispersiooni homogeensus, mille jaoks on andmeid vaja sobivalt teisendada. Doosirühmi tuleks võrrelda kontrollrühmaga, kasutades selliseid meetodeid nagu ANOVA, millele järgnevad paariviisilised võrdlused (nt Dunnetti ühepoolne test) ja statistilise erinevuse kriteerium, näiteks $p \leq 0,05$. Tuleb kindlaks teha rühmad, milles on saavutatud statistiline olulisus. Elundite suhtelisi masse kehamassi suhtes tuleks siiski vältida, kuna selline andmetöötlus tugineb vääradele statistilistele eeldustele.
60. Androgeeniagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult kandeainet. Uuritava kemikaali toimeviisi omadused võivad põhjustada eri kudedel suhteliselt erinevat toimet; näiteks trenbuloon, mida ei saa 5 α -taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le ja GP-le kui TP. Statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) massi suurenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul tuleks lugeda androgeeniagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudede puhul peaks olema näha vähemalt mingisugust kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.
61. Androgeeniantagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult võrdlusandrogeeni (ainult testosteroon-propionaati). Uuritava kemikaali toimeviisi omadused võivad põhjustada eri kudedel suhteliselt erinevat reageerimist; näiteks 5 α -reduktaasi inhibiitorid, nagu finasteriid, mõjutavad tugevamini ventraalset eesnääret kui muid kudesid, võrreldes tugevate androgeenireseptori antagonistidega nagu flutamiid. Statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) massi vähenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul, võrreldes ainuüksi TP-d saanud kontrollrühmaga, tuleks lugeda androgeeniantagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudede puhul peaks olema näha vähemalt mingil määral vähenenud kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.
62. Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina: keskvärtus, keskvärtuse standardviga (sobib ka standardhälve) ja iga rühma valimi suurus. Samuti tuleks lisada üksikandmete tabelid. Tuleks uurida kontrollrühma konkreetseid väärtusi, keskvärtust, keskvärtuse viga (standardhälvet) ja variatsioonikoefitsienti (CV), et teha kindlaks, kas need vastavad varasemate väärtustega kooskõla kriteeriumidele. CV väärtused, mis ületavad tabelis 1 (vt punktid 25 ja 26) esitatud CV väärtusi iga organi massi puhul, peaksid näitama, kas andmete lugemisel või registreerimisel on tehtud vigu või kas labor ei ole veel saavutanud androgeenisõltuvate kudede väljalõikamiseks vajalikku meisterlikkust ja/või oleks täiendavat koolitust või harjutamist. Üldiselt on CV-d (saadakse standardhälbe jagamisel organi

massi keskvaartusega) eri laborite ja eri uuringute tulemuste võrdlemisel korratavad. Esitatud andmed peaksid hõlmama vähemalt järgmist: ventraalse eesnäärme, seemnepõiekestest, *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste, Cowperi näärmete, suguti pea, maksa ja keha mass ning kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni. Võib esitada ka parandatud andmed, millesse on kovariatsiooni abil tehtud kehamassi muutumist arvestavad parandid, kuid see ei tohiks asendada korrigeerimata andmete esitamist. Lisaks sellele, kui eesnaha eraldumist (*preputial separation*, PPS) mõnes rühmas ei esine, tuleks registreerida PPS ja võrrelda seda statistiliselt olukorraga kontrollrühmas, kasutades Fisheri täpset testi.

63. Arvutisse sisestatud andmete kontrollimisel võrdluses originaalandmete lehtedega tuleb hoolikalt uurida organite kaalu väärtusi, mis ei ole bioloogiliselt usutavad või erinevad rohkem kui kolm standardhälvet vastava katserühma keskvaartusest; sellised andmed tuleb võib-olla välja jätta kui tõenäolised registreerimisvead.
64. Sageli on uuringu tulemuste võrdlemine OECD CV väärtustega (tabel 1) tõlgendamise oluline etapp, mis näitab uuringu tulemuste kehtivust. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemaid andmeid. Samuti tuleks laboris säilitada andmed positiivsete võrdluskemikaalide nagu TP ja FT toime kohta. Laborid võivad perioodiliselt testida ka teadaolevalt nõrkade androgeeniagonistide ja -antagonistide toimet ning säilitada need andmed. Neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate OECD andmetega selle kontrollimiseks, et labori meetodid annavad piisava statistilise täpsuse ja võimsuse.

1. liide

MÕISTED

Androgeenne – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju androgeenisõltuvate kudede kasvule.

Antiandrogeenne – kemikaali võime alla suruda testosteroonpropionaadi toimet imetajate organismile.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Hershbergeri biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks mg kehamassi kg kohta päevas).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

Kemikaal – aine või segu.

Spetsiifilisus – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel ei ole katsega kontrollitavat omadust.

Suremas olev – termin, millega kirjeldatakse surmaeelses seisundis looma.

Sünnijärgne päev X – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

Sünnikuupäev – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

Tundlikkus – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel on katsega kontrollitav omadus.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

Märkus: dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik

Tase 1 Sortimine ja prioriteedi omistamine olemasoleva teabe põhjal	— füüsikalised ja keemilised omadused, nt molekulmass, reaktsioonivõime, lenduvus, biolagunevus — inimese ja keskkonna kokkupuude, nt tootmismahd, heide keskkonda, kasutusviisid — ohud, nt olemasolevad toksikoloogiaandmed
Tase 2 <i>In vitro</i> katsed, mis annavad andmeid mehhanismi kohta	— ÖR, AR, TR retseptorile sidumise afiinsus — Transkriptsiooni aktiveerimine — Aromataas ja steroidogenees <i>in vitro</i> — Arüülsüivesinike retseptori äratundmine/sidumine — kvantit. strukt.-aktiivsuse sõltuvused (QSAR) — Suure jõudlusega sõeluuringud — Kilpnäärmefunktsioon — Kala hepatotsüütide vitellogeniini (VTG) katse — Muud (vastavalt vajadusele)
Tase 3 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid ühe hormooni kohta Mehhanismid ja toimed	— Uterotroofne katse (östrogeenid) — Hershbergeri katse (androgeenid) — Hormooni retseptorisõltumatu toime — Muud (nt kilpnääre) — Kala VTG (vitellogeniin) katse (östrogeenid)
Tase 4 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid mitme hormooni kohta Mehhanismid ja toimed	— Tõhustatud OECD 407 (näitajad põhinevad endokriinmehhanismidel) — Isas-ja emasloomade puberteedikatsed — Täiskasvanud opereerimata isasloomade katse — Kala sugunäärmete histopatoloogia katse — Kullese metamorfoosi katse
Tase 5 <i>In vivo</i> katsed, mis annavad andmeid endokriinse jm mehhanismi põhjustatud toime kohta	— 1-põlvkonna-katse (tõhustatud TG 415)¹ — 2-põlvkonna-katse (tõhustatud TG 416)¹ — reproduktiivsõelumiskatse (tõhustatud TG 421)¹ — kombineeritud 28 päeva / reproduktiivsõelumise katse (tõhustatud TG 422)¹ — Osalise ja täiseluringi katsed kalade, lindude, kahepaiksete ja selgrootutega (areng ja paljunemine)

¹ VMG mamm kaalub võimalikke tõhustamisi

VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE

- Märkus 1: kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.
- Märkus 2: tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.
- Märkus 3: kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendama ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.
- Märkus 4: iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.
- Märkus 5: praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.
- Märkus 6: raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

KIRJANDUS

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

- 14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.
- 15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. Vt: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York: Academic Press, 151–220.
- 16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. New York: Humana Press, p 38.
- 17) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 18) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92–64–12367–9, Paris.
- 19) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- 20) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- 21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265–1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- 22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.
- 23) OECD (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- 24) OECD (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.
- 25) OECD (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.
- 26) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).
- 27) Käesoleva lisa järgmised peatükid:
B.1a. Äge suukaudne mürgisus — kindla annuse protseduur
B.1b. Äge suukaudne mürgisus — ägeda mürgisusastme meetod

B.56. LAIENDATUD ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTIIVTOKSILISUSE UURING

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 443 (2012). See põhineb Rahvusvahelise Bioteaduste Instituudi (Life Science Institute, ILSI), Tervise- ja Keskkonnateaduste Instituudi (Health and Environmental Sciences Institute, HESI), põllumajanduskemikaalide ohutuse hindamise (Agricultural Chemical Safety Assessment, ACSA) tehnilise komitee ettepanekul võtta aluseks elujärgu F₁ laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring, mille on avaldanud Cooper *et al.*, 2006 (1). Uuringu eeskirja on täiustatud ja selgitatud, et tagada paindlikust ja rõhutada, et oluline on alustada olemasolevatest teadmistest ja kasutada uuringu suunamiseks ja kohandamiseks elusloomadega tehtud tähelepanekuid. Käesolevas katsemeetodis on üksikasjalikult kirjeldatud laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu läbiviimist. Katsemeetodis kirjeldatakse kolme F₁-loomade kohorti:

kohort 1: hinnatakse paljunemist ja arengut iseloomustavaid näitajaid; seda kohorti võib laiendada, et hõlmata F₂-põlvkond;
kohort 2: hinnatakse kemikaaliga kokkupuute võimalikku mõju arenevale närvisüsteemile;
kohort 3: hinnatakse kemikaaliga kokkupuute võimalikku mõju arenevale immuunsüsteemile.

2. Otsused selle kohta, kas hinnata teist põlvkonda ja jätta ära arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse kohort ja/või arenguhäireid põhjustava immunotoksilisuse kohort, peaksid põhinema olemasolevatel teadmistel uuritava kemikaali kohta, samuti mitmesuguste reguleerivate asutuste vajadustel. Katsemeetodi eesmärk on anda üksikasjalist teavet selle kohta, kuidas uuringut võib teostada ja kuidas iga kohorti tuleks hinnata.
3. Otsustamise kord, millise sisekriteeriumi põhjal algatatakse 2. põlvkonna uuring, on kirjeldatud OECD suunisidokumendis 117 (39) reguleerivate asutuste jaoks, kes kasutavad sisekriteeriume.

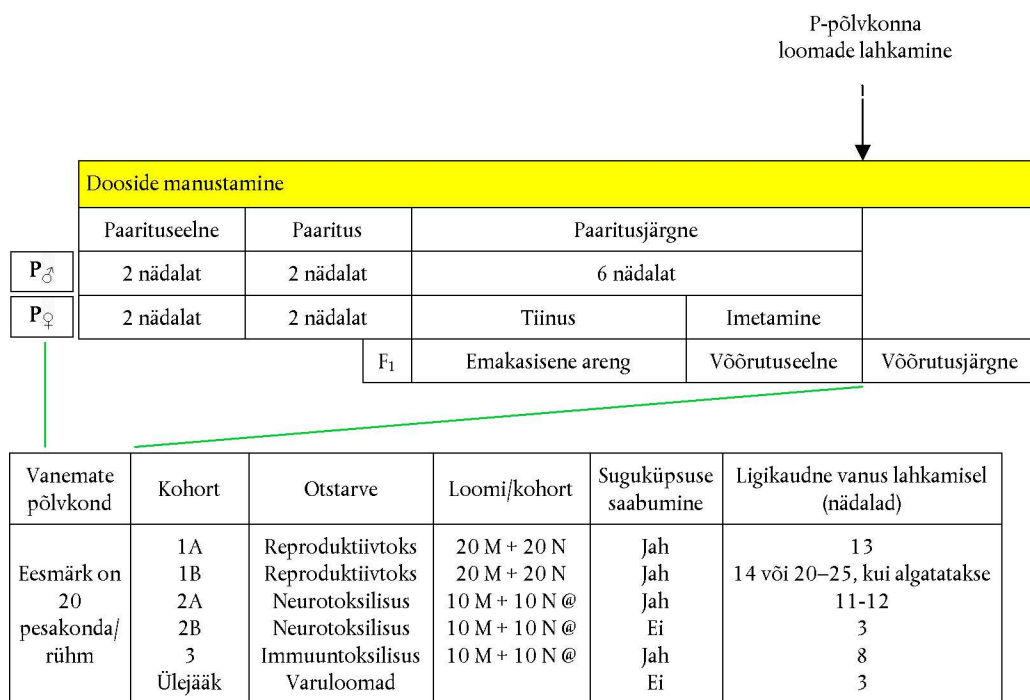
LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu peamine eesmärk on hinnata konkreetseid eluetappe, mida ei hõlma muud tüüpi mürgisuse uuringud, ja uurida toimet, mis võib ilmnedas kemikaaliga sünnieelse ja -järgse kokkupuute puhul. Paljunemiskriteeriumiga seotud näitajate uurimiseks on kavandatud, et esimese etapina tuleb võimaluse korral kasutada korduvdoosi uuringutest saadud teavet (sh reproduktiivtoksilisuse sõeluuringud, nagu OECD katsejuhend 422 (32)) või kiireid sisekreetsiooniüsteemi häirivate kemikaalide sõelkatseid (nt utero-troofne katse, katsemeetod B.54 (36), ja Hershbergeri katse, katsemeetod B.55 (37)), et teha kindlaks mõju isas- ja emasloomade reproduktiivorganitele. See võib hõlmata spermatogeneesi (munandite histopatoloogia) isasloomadel ning innatsükleid, folliikulite loendamist või munarakkude valmimist ja munasarjade kahjustusi (histopatoloogia) emasloomadel. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring võimaldab leida paljunemisega seotud näitajaid, mille määramiseks on vaja isasloomade suhtlemist emasloomadega, emasloomade vastastikust toimet areneva lootega ning emasloomade suhtlemist järglaste ja F₁-põlvkonnaga kuni ajani pärast seksuaalse küpsuse saabumist (vt käesolevat katsemeetodit toetav OECD juhenddokument nr 151 (40)).
5. Katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata kemikaaliga sünnieelse ja -järgse kokkupuute mõju arengule, samuti selleks, et põhjalikult hinnata süsteemset toksilisust tiinete ja imetavate emasloomade, noorte ja täiskasvanud järglaste puhul. Katsega tahetakse üksikasjalikult uurida peamisi arenguga seotud näitajaid, nagu järglaste eluvõime, vastündinute tervises seisund, sünniaegsed arengunäitajad ning füüsiline ja funktsionaalne areng kuni täisikka jõudmiseni, et teha kindlaks konkreetsed sihtelundid järglaste puhul. Lisaks annab uuring teavet uuritava kemikaali mõju kohta täiskasvanud isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemi kahjustuste ja toimimise kohta või kinnitab sellist teavet. Muu hulgas vaadeldakse järgmisi näitajaid: gonaadide toimimine, innatsükkel, spermatoosidide küpsemine munandimanustes, paaritumiskäitumine, viljastumine, tiinus, poegimine ja imetamine. Lisaks võimaldab arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse ja arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse kohta saadav teave iseloomustada mõju nimetatud süsteemidele. Nende katsetega saadavad andmed peaksid võimaldama määrata täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldava doosi (NOAEL), vähima täheldatavat kahjulikku toimet avaldava doosi (LOAEL) ja/või võrdlusdoosid mitmesuguste näitajate puhul ning võimaldama selgitada varasemates korduvdoosi uuringutes täheldatud mõju või aitama kavandada edasisi uuringuid.
6. Katse-eeskirja skeem on esitatud joonisel 1. Uuritavat kemikaali manustatakse erinevates doosides pidevalt mitmele suguküpsete isas- ja emasloomade rühmale. Vanemate (P) põlvkonna katseloomadele manustatakse kemikaali teatava aja jooksul enne paaritumist (aeg valitakse uuritava kemikaali kohta teadaoleva teabe alusel, kuid vähemalt kaks nädalat) ja kahe nädalase paaritumisperioodi ajal. P isasloomadele manustatakse kemikaali vähemalt kuni F₁-järglaste võõrutamiseni. Kemikaali tuleks neile manustada vähemalt 10 nädala jooksul. Kemikaali võib manustada ka kauem, kui on vaja selgitada mõju paljunemisele. P-põlvkonna emasloomadele jätkatakse kemikaali manustamist tiinuse ja imetamise ajal kuni katse lõpetamiseni pärast järglaste võõrutamist (st 8–10 nädalat). F₁-järglastele manustatakse uuritavat kemikaali edasi võõrutusperioodist kuni täiskasvanuks saamiseni. Kui hinnatakse teist põlvkonda (vt OECD juhenddokument nr 117 (39)), jätkatakse F₁-järglastele kemikaali manustamist kuni F₂-põlvkonna võõrutamiseni või uuringu lõpetamiseni.
7. Kõikidel loomadel tehakse kliinilisi vaatlusi ja patoloogilisi uuringuid mürgistuse sümptomite tuvastamiseks; erilist tähelepanu pööratakse isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemi rikkumatuks ja selle toimimisele, samuti järglaste tervisele, kasvule, arengule ja toimimisele. Võõrutamise ajal määratakse valitud järglased allrühmadesse (kohordid 1–3, vt punktid 33 ja 34 ning joonis 1) edasiseks uurimiseks, mis hõlmab seksuaalse küpsemise, suguelundite struktuurikahjustuste ja toimimise, neuroloogiliste ja käitumuslike näitajate ning immuunfunktsioonide uurimist.
8. Uuringu tegemisel järgitakse juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 ohutuse hindamisel kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kui humaansete näitajate kindlaks tegemise, hindamise ja kasutamise kohta (34).

9. Kui on olemas piisav arv uuringuid, et teha kindlaks uue uurimismeetodi mõju, vaadatakse katsemeetod läbi ja vajaduse korral muudetakse, et võtta arvesse saadud kogemused.

Joonis 1

Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu skeem



@ üks pesakonna kohta ja esindab võimaluse korral kokku 20 pesakonda

MEETODI KIRJELDUS JA KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomad

Loomaliigi ja -liini valimine

10. Reproduktiivtoksilisuse katses kasutatava loomaliigi valimist tuleks hoolikalt kaaluda ja võtta arvesse kogu kättesaadav teave. Kuna rotiga on olemas väga palju taustaandmeid ja on võimalikud võrdlused üldise mürgisuse katsetega, on eelistatud liigiks tavaliselt rott ning käesolevas meetodi kirjelduses esitatud kriteeriumid ja soovitusel kehtivad roti kohta. Kui kasutatakse muud liiki, tuleks seda põhjendada ja teha asjaomased muudatused katseeskirjas. Liine, kellel on madal sigivus või kellel teatakse olevat iseeneslikke arenguhäireid, ei tohiks kasutada.

Vanus, kehamass ja katses kasutamise kriteeriumid

11. Vanematena (parent, P) tuleks kasutada terveid loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Tuleks uurida nii isaskui ka emasloomi ja emasloomad peaksid olema poegimata ja mitte tiined. P-loomad peaksid olema saavutanud suguküpsuse, olema dooside manustamise alguses sarnase kehamassiga (samast soost loomade hulgas), olema paaritamise ajal sarnases vanuses (ligikaudu 90 päeva) ning olema tüüpilised uuringus kasutatava loomaliigi ja -liini jaoks. Loomadel tuleks pärast saabumist lasta vähemalt 5 päeva aklimatiseeruda. Loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja doosirühmadesse niimoodi, et rühmades olevate loomade kehamassi keskväärtused oleksid võrreldavad (st ± 20 % keskväärtusest).

Pidamis- ja söötmingimused

12. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema 30–70 %, ideaaljuhul 50–60 %. Kunstlik valgustus peaks olema järgmine: 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Kasutada võib

tavapäraselt katseloomadele ettenähtud sööta ning joogivee hulk peab olema piiramatult. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sööda fütoöstrogeenisaldusele, kuna fütoöstrogeenide suur sisaldus söödas võib mõjutada reproduktiiv-funktsiooni määratavaid näitajaid. Soovitatakse kasutada standarditud, teadaoleva koostisega sööta, milles östrogeenide kemikaalide sisaldus on vähendatud (2, 30). Söödavalikut võib mõjutada vajadus kindlustada sobiva lisasegu lisamine, kui uuritavat kemikaali manustatakse sellisel viisil. Tuleks määrata uuritava kemikaali sisaldus, homogeensus ja stabiilsus kandeaines. Söödas ja joogivees tuleks korrapäraselt määrata saasteainete sisaldus. Uuringu ajal kasutatud iga söödapartii proovid tuleks säilitada sobivates tingimustes (nt külmutatult -20°C juures) kuni uuringu lõpuni juhaks, kui tulemustest selgub, et sööda komponente oleks vaja täiendavalt uurida.

13. Loomad peavad olema puurides väikeste rühmadena, igas puuris on samast soost ja sama doosirühma loomad. Loomi võib hoida ka üksikult, et vältida võimalikke vigastusi (nt isasloomad pärast paaritumisperioodi). Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud sobivates puurides. Kui on saadud tõendid kopulatsiooni kohta, paigutatakse tiineks peetavad emasloomad eraldi poegimis- või pesakonnapuuridesse ja varustatakse nad ettenähtud sobiva ja kindlaksmääratud pesamaterjaliga. Pesakondi peetakse koos emaga kuni võõrutamiseni. F_1 -loomi tuleb pidada väikeste rühmadena, igas puuris on samast soost ja sama doosirühma loomad võõrutusperioodist kuni uuringu lõpetamiseni. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib loomi pidada üksikult. Fütoöstrogeenide sisaldus valitud allapanumaterjalis peaks olema minimaalne.

Loomade arv ja märgistamine

14. Tavaliselt peaks igas doosi- ja kontrollrühmas olema piisav arv paarituvaid loomi, nii et igas doosirühmas oleks vähemalt 20 tiinet emaslooma. Eesmärk on saada piisavalt tiinusjuhtumeid, et oleks võimalik mõistlikult hinnata kemikaali võimet mõjutada P-põlvkonna viljakust, tiinust ja vanemakäitumist ning F_1 -põlvkonna järglaste kasvu ja arengut viljastumisest kuni suguküpsuseni. Kui vajalikku arvu tiineid loomi ei saada, ei tähenda see veel tingimata katse kehtetuks tunnistamist; iga üksikjuhtu tuleb eraldi hinnata ja kaaluda, kuivõrd see võib mõjutada uuritava kemikaali hindamist.
15. Igale P-loomale omistatakse kordumatu tunnusnumber enne dooside manustamise algust. Kui varasemad labori-andmed näitavad, et olulisel osal emasloomadest ei tarvitse esineda korrapäraseid innatsükleid (4 või 5 päeva), soovitatakse enne dooside manustamise algust hinnata innatsükleid. Alternatiivina võib rühmasid suurendada, et vähemalt 20 emasloomal igas rühmas oleksid tagatud korrapäraseid innatsüklid (4 või 5 päeva) dooside manustamise alguses. Vastsündinute esmakordsel vaatlusel sündimispäeval või sündimisele järgneval päeval (*postnatal day*, PND) 0 või 1 märgistatakse kõik F_1 -järglased kordumatu märgisega. Andmeid F_1 -järglaste ja, vajaduse korral, F_2 -järglaste päritolupesakonna kohta tuleb säilitada kogu uuringu jooksul.

Uuritav kemikaal

Olemasolev teave uuritava kemikaali kohta

16. Oluline on läbi vaadata olemasolev teave, et teha otsused manustamisviisi, kandeaine, loomaliigi, dooside valiku kohta, samuti otsused dooside manustamise ajakava võimaliku muutmise kohta. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu kavandamisel tuleks seepärast võtta arvesse kogu asjakohane olemasolev teave: uuritava kemikaali füüsikalise-keemilised ja toksiko-kineetilised omadused (sealhulgas liigispetsiifiline metabolism), toksikodünaamilised omadused, struktuuri-aktiivsuse sõltuvused (SAR), *in vitro* kindlaks tehtud metaboolsed protsessid, mürgisuse uuringute tulemused ja asjakohane teave struktuurianaloogide kohta. Esialgset teavet imendumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamise (ADME) ning bioakumulatsiooni kohta võib tuletada keemilisest struktuurist, füüsikalise-keemilistest andmetest, plasmavalkude sidumise ulatusest või toksiko-kineetilistest (TK) uuringutest, samal ajal kui mürgisusuuringute tulemused annavad lisateavet, nt NOAELi, metabolismi või selle indutseerimise kohta.

Toksiko-kineetiliste andmete kaalumise

17. Kuigi TK andmeid ei nõuta, võivad varasemad TK andmed doosivahemiku määramise või muudest katsetest olla uuringu kavandamisel, dooside valimisel ja tulemuste tõlgendamisel olla väga kasulikud. Eriti kasulikud on andmed, mis: 1) lubavad kontrollida areneva loote ja poegade kokkupuudet uuritava kemikaaliga (või asjakohaste metaboliitidega), 2) võimaldavad saada sisemise dosimeetria hinnangu ja 3) võimaldavad hinnata võimalikke

doosist sõltuvaid küllastunud kineetilisi protsesse. Täiendavaid TK andmeid, näiteks metaboliidiprofiile, kontsentratsiooni-aja kõveraid jne, tuleks samuti arvesse võtta, kui need on kättesaadavad. Täiendavaid TK andmeid võib koguda ka põhikatsel ajal tingimusel, et see ei takista põhiuuringu näitajate kogumist ja tõlgendamist.

Üldjuhul on laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu kavandamisel kasulikud järgmised TK andmed:

- hiline tiinus (nt 20. päev pärast tiinestumispäeva) — emalooma veri ja loote veri;
- keskmine imetamisperiood (PND 10) — ema veri, järglaste veri ja/või piim;
- varajane võõrutusjärgne periood (nt PND 28) — võõrutatud poegade vereproovid.

Konkreetsete analüüsitava aine (nt lähtekemikaal ja/või metaboliidid) ja proovivõtmise kava kindlaksmääramisel tuleks olla paindlik. Näiteks sõltub teataval proovivõtupäeval võetavate proovide arv ja võtmise aeg kokkupuutumistest ja eelteadmistest TK omaduste kohta mittetiine looma puhul. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, on piisav, kui proove võetakse kõikidel päevadel ühel sobival ajal; dooside manustamisel sondi kaudu võib vaja olla täiendavaid proovivõtuaegu, et saaks paremini hinnata sisemiste dooside vahemikku. Siiski ei ole vaja ühelgi proovide võtmise päeval saada kontsentratsiooni ajast sõltuvuse täielikku kõverat. Vajaduse korral võib ühes pesakonnas kummaski soost loodete ja vastsündinute vereproovid koondada.

Manustamistee

18. Manustamistee valimisel tuleks arvestada kokkupuuteviise, mis on inimese kokkupuute puhul kõige asjakohasemad. Kuigi katse-eeskiri on koostatud nii, et uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib seda muuta, et manustada kemikaali muul viisil (joogivee, sondi kaudu, sissehingamise teel, naha kaudu), olenevalt kemikaali omadustest ja teabest, mida tahetakse saada.

Kandeaiane valimine

19. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Soovitatakse võimaluse korral kaaluda kõigepealt vesilahuse/suspensiooni kasutamist, seejärel õilahuse/õlilisuspensiooni (nt maisiõli) kasutamist. Muu kandeaiane kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks vältida selliste kandeainete kasutamist, mis võivad ise olla mürgised (nt atsetoon, dimetüülsulfoksiid). Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kandeaiane või muu lisaaine kasutamisel tuleks kaaluda järgmist: nende mõju uuritava kemikaali imendumisele, jaotumisele, metabolismile või peetumisele organismis; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võib muuta selle toksilisi omadusi, ning mõju loomade sööda- või veetarbimisele või toitumisele.

Doosi valimine

20. Tavaliselt peaks uuring hõlmama vähemalt kolme doosimäära ja samaaegset kontrolli. Sobiva doositaseme valimisel peab uurija arvestama kogu kättesaadavat teavet, sealhulgas varasemate uuringutega dooside kohta saadud teavet, tiinete ja mittetiinete loomadega saadud toksiko-kineetilisi andmeid, imetamisel piimaga edasikandumise ulatust ja inimeste kemikaaliga kokkupuute hinnanguid. Kui on olemas TK andmed, mis näitavad TK-protsesside küllastumist dooside suurendamise korral, tuleks vältida suurte dooside kasutamist, mille juures selgelt esineb küllastumine, loomulikult tingimusel, et inimeste kokkupuute on eeldatavasti tunduvalt allpool küllastumispunkti jõudmist. Sellistel juhtudel peaks suurim doos olema murdepunkti kohal või veidi üle selle punkti, kus algab mittelineaarne toksiko-kineetika.
21. Kui asjakohased TK andmed puuduvad, peaksid doositasemed põhinema mürgisusel, kui neid ei piira uuritava kemikaali füüsikalise-keemilised omadused. Kui doositasemed põhinevad mürgisusel, valitakse kõrgeim doos nii, et see põhjustaks teatavat süsteemset toksilisust, kuid mitte loomade surma ega tõsiseid kannatusi.
22. Doosimäärade alanev järjestus tuleks valida nii, et näidata doosiga seotud mõju ja teha kindlaks täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldav doos või mõju avastamise piiri lähedane doos, mis võimaldaks leida võrdlusdoosi kõige tundlikuma(te) näitaja(te) jaoks. Sageli on optimaalsed kahe- või neljakordsed dooside vahemikud, et dooside vahemik NOAELi ja LOAELi vahel ei oleks liiga suur. Väga suure doosivahemiku (nt üle 10 korra) kasutamisele on sageli eelistatav neljanda doosirühma lisamine.

23. Kontrollrühma loomi koheldakse samamoodi kui doosirühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kontrollrühm on rühm, kellele doose ei manustata või manustatakse kahjutut ainet või kandeainet, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet suurimas kasutatud mahus.

Piirsalduskatse

24. Kui korduvdoosi uuringutes ei ole leitud tõendeid mürgisuse kohta doosis vähemalt 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas või kui andmete põhjal, mis on saadud struktuuri või metabolismi poolest sarnaste kemikaalidega (metabolism on *in vivo* või *in vitro* andmete järgi sarnane), ei pruugi mitme doositasemega uuring olla vajalik. Sellisel juhul võiks laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu teha kontrollrühma ja ainult ühe doosirühmaga, milles doos on 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Kui aga sellise piirsalduskatsesega leitakse tõendeid reproduktiivtoksilisuse või arenguhäireid põhjustava toksilisuse kohta, tuleb teha uuring madalamate doositasemetega, et leida NOEL. Sellised kaalutlused piirsalduskatse kohta kehtivad ainult juhul, kui inimese kokkupuude ei viita sellele, et on vaja uurida kõrgemat doositaset.

EESKIRJAD

Järglaste kokkupuude

25. Kemikaali manustamine sööda kaudu on eelistatud meetod. Sondiuuringute tegemise kohta tuleks märkida, et imetatavad pojad saavad uuritavat kemikaali tavaliselt üksnes kaudselt, piimaga; otsene dooside manustamine algab nende jaoks võõrutamise ajal. Sööda või joogiveega manustamise uuringutes hakkavad pojad uuritavat kemikaali otse saama siis, kui nad imetamisperioodi viimasel nädalal hakkavad ise sööma. Kui uuritavat kemikaali eritub piima sisse vähe ja kui ei saa tõendada järglaste pidevat kokkupuudet kemikaaliga, tuleks kaaluda uuringu korralduse muutmist. Sellistel juhtudel tuleks kaaluda vahetut manustamist poegadele imetamise ajal, võttes arvesse TK kohta olemas olevat teavet, toksilisust järglastele või muutusi biomarkerites (3, 4). Enne imetatavatele poegadele dooside otsese manustamise uuringu tegemist tuleks hoolikalt kaaluda eeliseid ja puudusi (5).

Doseerimise ajakava ja doseerimine

26. Teave innatsükli, isas- ja emassuguelundite histopatoloogia ja munandi/munandimanuse spermaanalüüsi kohta võib olla juba varem saadud piisavalt pikkade korduvdoosiuuringutega. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringus valitakse paarituseelse dooside manustamise kestus nii, et näha mõju funktsionaalsetele muutustele, mis võivad segada paaritumiskäitumist ja viljastamist. Paarituseelne dooside manustamine peab olema piisavalt pikk, et saavutada püsioleku kokkupuutetingimused P põlvkonna emas- ja isasloomade puhul. Enamikul juhtudest peetakse mõlema soo puhul piisavaks kahenädalast dooside manustamist enne paaritumist. Emasloomade puhul hõlmab see 3–4 täielikku innatsükli ja see peaks olema piisav, et avastada kõik kahjulikud mõjud innatsüklile. Isasloomade puhul vastab see ajale, mis kulub küpseva spermatoosoidi liikumiseks läbi munandimanuse, ja see peaks lubama avastada paaritamisel munandijärgse mõju spermale (spermatogeneesi lõppstaadiumides ja munandimanuses küpsemise ajal). Uuringu lõpetamise ajaks, kui uuritakse munandi ja munandimanuse histopatoloogiat ja tehakse sperma näitajate analüüs, on P- ja F₁-põlvkonna isasloomad uuritava kemikaaliga kokku puutunud vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi protsessi jooksul (6, 7, 8, 9) ja OECD juhenddokument nr 151 (40)).
27. Paarituseelse kokkupuute stsenaariume isasloomade puhul võiks kohandada, kui varasemate uuringutega on selgelt kindlaks tehtud mürgisus munandite jaoks (spermatogeneesi häired) või mõjud seemnerakkude struktuurile ja funktsioonile. Samamoodi võib emasloomade puhul olla põhjendatud kokkupuutestsenariumi muutmine, kui on teada, et uuritav kemikaal mõjutab innatsükli ja seega tiinestumisvõimet. Erijuhtudel võib olla lubatav, et P-põlvkonna emasloomadele hakatakse uuritavat kemikaali manustama alles pärast seda, kui on saadud sperma suhtes positiivne tupeäie (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)).
28. Kui paarituseelne kemikaali manustamise periood on kindlaks määratud, tuleks uuritavat kemikaali loomadele pidevalt manustada 7 päeval nädalas kui lahkamiseni. Kõigile loomadele tuleks uuritavat kemikaali manustada sama meetodiga. Dooside manustamist tuleks jätkata 2-nädalase paaritumisperioodi jooksul ja P-põlvkonna emasloomadele kogu tiinuse ja imetamise vältel kuni uuringu lõpetamiseni pärast võõrutamist. Isasloomadele tuleb doose manustada samal viisil kuni katse lõpetamiseni, kui F₁-põlvkonna loomad võõrutatakse. Lahkamise juures tuleks eelkõige pida kinni emaste lahkamise ajakavast, kuna emasloomad tuleks lahata ühel ja samal või lähedasel imetamispäeval. Isasloomade lahkamine võib jaotuda suuremale arvule päevadele, olenevalt labori

võimalustest. Kui otsest dooside manustamist ei ole alustatud juba imetamise ajal, alustatakse valitud F_1 -põlvkonna isas- ja emasloomadele kemikaali otsest manustamist võõrutamise ajal ja seda tuleks jätkata kuni kavandatud lahkamiseni, sõltuvalt kohorti määramisest.

29. Kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehamassile; valitud võimalus tuleks selgelt määratleda.
30. Kui uuritavat kemikaali manustatakse sondiga, ei tohiks ühe korraga manustatav vedelikukogus ületada tavaliselt 1 ml 100 g kehamassi kohta (õli, näiteks maisiõli puhul on maksimumkogus 0,4 ml 100 g kehamassi kohta). Välja arvatud ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide dooside korral jääks samaks. Doos tuleks manustada iga päev samal kellaajal. Iga looma doos peab tavaliselt põhinema kõige viimaselkehamassi määramisel ja seda kohandatakse vähemalt kord nädalas täiskasvanud isas- ja täiskasvanud viljastamata emaslooma puhul ning iga kahe päeva järel tiine emaslooma ja F_1 -põlvkonna loomadel, kui kemikaali manustatakse enne võõrutamist ja 2 nädala jooksul pärast võõrutamist. Kui TK andmed viitavad uuritava kemikaali vähesele ülekandele läbi platsenta, tuleb tiinuse viimasel nädalal võib-olla kohandada sondiga manustatavat doosi, et vältida tiinele emasloomale liiga mürgise doosi manustamist. Emasloomale ei tohiks poegimise päeval kemikaali manustada sondiga või muul viisil, mille juures emasloom tuleb kätte võtta; kemikaali manustamata jätmine sel päeval on parem kui poegimisprotsessi häirimine.

Paaritumine

31. Iga P-põlvkonna emane tuleks panna ühte puuri ühe juhuslikult valitud mitte suguluses oleva isasloomaga, kes kuulub samasse doosirühma (paaritamine 1: 1), kuni täheldatakse kopulatsiooni tõendeid või on möödunud 2 nädalat. Kui isasloomi ei ole piisavalt, kuna isasloomi on näiteks surnud enne paaritumist, võib panna juba pairitunud (1: 1) isaslooma kokku teise emasloomaga, nii et kõik emasloomad saavad pairitatud. Tiinuse 0-päevaks peetakse päeva, mil leitakse tõendeid paaritumise kohta (leitakse vaginaalkork või spermat). Loomad tuleks teineteisest võimalikult kiiresti eraldada pärast tõendite saamist kopulatsiooni toimumise kohta. Kui paaritumine ei ole kahe nädala pärast toimunud, tuleks loomad eraldada, andmata neile täiendavat võimalust paaritumiseks. Pairitunud paarid tuleks andmetes selgesti ära näidata.

Pesakonna suurus

32. Neljandal poegimisjärgsel päeval võib iga pesakonna suurust korrigeerida, eemaldades juhuvalikuga liigsed pojad nii, et tulemuseks oleks võimalikult täpselt viis emast ja viis isast pesakonna kohta. Poegade selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi põhjal, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste poegade arv ei võimalda koostada pesakonda viiest kummaski soost pojast, on sobiv ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast).

Poegade valimine võõrutusjärgsete uuringute jaoks (vt joonis 1)

33. Võõrutamisel (umbes päeval PND 21) valitakse kõigist kättesaadavatest pesakondadest pojad edasiseks uurimiseks, kuni 20 poega igasse doosirühma ja kontrollrühma, ning peetakse neid kuni suguküpsuse saabumiseni (kui katseid ei ole vaja teha varem). Pojad valitakse juhuvaliku alusel, kuid välja jäetakse ilmselt kängujäänud pojad (loomad, kelle kehamass erineb keskmisest sama pesakonna järglase kaalust rohkem kui kahe standardhälbe võrra), kuna selliseid poegi ei saa pidada katserühma suhtes esindavaks.

Päeval PND 21 määratakse väljavalitud F_1 -põlvkonna pojad juhuvaliku alusel ühte loomade kolmest kohordist:

kohort 1 (1A ja 1B) = reproduktiivtoksilisuse/arenguhäireid põhjustava toksilisuse katse;

kohort 2 (2A ja 2 B) = arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse;

kohort 3 = arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse katse.

Kohort 1A: üks isas- ja üks emasloom/pesakond/rühm (20/sugu/rühm): eelistatud valik reproduktiivsüsteemi ja üldise mürgisuse esmaseks hindamiseks.

Kohort 1B: üks isas- ja üks emasloom/pesakond/rühm (20/sugu/rühm): eelistatud valik paljunemisfunktsiooni hindamiseks paarituvatel F1-loomadel, kui seda hinnatakse (vt OECD juhenddokument nr 117 (39), ja täiendavate histopatoloogiaandmete saamiseks, kui kahtlustatakse reproduktiivsüsteemi või sisesekretsiooni kahjustavat mürgisust või kui kohordi 1A tulemused ei ole ühesed.

Kohort 2A: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks isasloom ja üks emasloom pesakonna kohta), mis eraldatakse käitumishäirete neuroloogia uurimiseks, millele järgneb täiskasvanute neurohistopatoloogiline hindamine.

Kohort 2B: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks isas- ja üks emasloom pesakonna kohta), mis määratakse neurohistopatoloogiauuringuks võõrutamise ajal (PND 21 või PND 22). Kui loomi ei ole piisavalt, tuleb loomad esmalt määrata kohorti 2A.

Kohort 3: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks poeg igast pesakonnast kui võimalik). Vaja võib minna täiendavaid poegi kontrollrühmast, et nad toimiksid positiivse kontrolli loomadena T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katses (*T-cell dependant antibody response assay*, TDAR) päeval PND 56 ± 3.

34. Kui pesakonnas ei ole piisavalt poegi kõigi kohortide komplekteerimiseks, on eelistatav kohort 1, kuna seda saab laiendada F₂-põlvkonna saamiseks. Konkreetse küsimuse lahendamiseks võib igasse kohorti määrata täiendavaid poegi, näiteks kui kemikaalil kahtlustatakse neuro-, immuun- või reproduktiivtoksilisust. Selliseid poegi võib kasutada uuringuteks eri ajahetkedel või täiendavate näitajate määramiseks. Pojad, keda kohortidesse ei määrata, kasutatakse kliinilise biokeemia analüüsideks (punkt 55) ja üldiseks lahkamiseks (punkt 68).

P-loomade teine paaritamine

35. Teist paaritamist P-loomade puhul tavaliselt ei soovitata, kuna sellega kaotatakse olulist teavet pesastumiskohtade arvu kohta (ja sellega pesastumisjärgselt ja sünni läheduses hukkunud loodete arvu kohta, mis võib näidata aine võimalikku teratogeensust) esimese pesakonna puhul. Kui on vaja kontrollida või selgitada kemikaali mõju kemikaaliga kokkupuutunud emasloomadele, siis on parem laiendada uuringut ja lisada F₁-põlvkonna paaritumine. Siiski on P-põlvkonna isasloomade teine paaritumine töötlemata emasloomadega alati üks võimalus, millega saab selgitada vastuolulisi tulemusi või täiendavalt iseloomustada mõju viljakusele, mida täheldati esimesel paaritumisel.

ELUPUHUSED VAATLUSED

Kliinilised vaatlused

36. P-põlvkonna ja valitud F₁-põlvkonna loomade üldine kliiniline vaatlus tehakse kord päevas. Kemikaali sondi kaudu manustamise korral tuleks kliinilised vaatlused teha enne ja pärast manustamist (et näha võimalikke toksilisuse märke, mis on seotud maksimaalse kontsentratsiooniga vereseerumis). Asjakohased käitumise muutused, raske või pikaleveniva poegimise märgid ja kõik mürgistuse tunnused tuleks registreerida. Kaks korda päevas, nädalavahehelusel kord päevas tuleks kontrollida kõiki loomi raske mürgistuse, haigestumise või surma tuvastamiseks.
37. Lisaks uuritakse iga nädal üksikasjalikumalt kõiki P- ja F₁-põlvkonna loomi (pärast võõrutamist) ja kõige parem oleks seda teha looma kaalumise ajal, et vähendada kättevõtmisega seotud stressi. Vaatlused tuleks teha hoolikalt ja kõik leiud registreerida, kasutades katselaboris määratud punktisüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimuste varieeruvus oleks minimaalne. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised märgid: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestadel, eritiste ja väljaheidete esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad kättevõtmisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldus, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi kõndimine).

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

38. P-põlvkonna loomad kaalutakse dooside manustamise esimesel päeval ja seejärel vähemalt kord nädalas. Lisaks kaalutakse P-põlvkonna emasloomi imetamise ajal samadel päevadel, kui kaalutakse nende pesakonna poegi (vt punkt 44). Kõik F₁-põlvkonna loomad kaalutakse individuaalselt võõrutamisel (PND 21) ja seejärel vähemalt kord nädalas. Kehamass registreeritakse ka päeval, kui loomal algab puberteet (eesnaha täielik eraldumine või tupe avanemine). Kõik loomad kaalutakse surmamisel.
39. Uuringu ajal registreeritakse sööda ja vee tarbimine (kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega) vähemalt kord nädalas samal päeval looma kehamassi registreerimisega (välja arvatud kooselu ajal). Iga puuri F₁-põlvkonna loomade söödatarbimine registreeritakse iga nädal, alates teatavasse kohorti valimisest.

Innatsükliid

40. Eelteave innatsükli muutuste kohta uuritava kemikaali toimel võib olla saadud juba varasemate korduvdoosi mürgisuse uuringutega ja seda võib kasutada konkreetse uuritava kemikaaliga tehtava laiendatud ühe-põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu eeskirja koostamisel. Tavaliselt alustatakse innatsükli hindamist (vaginaaltsüto- loogia abil) dooside manustamise alguses ja jätkatakse kuni paaritumise kinnituse saamiseni või kahe nädalase paaritumisaja lõpuni. Kui emasloomi on enne dooside manustamist kontrollitud tavalise innatsükli seisukohast, siis on kasulik jätkata tupenõre äiete tegemist pärast dooside manustamise algust, kuid kui dooside manustamise alguses tekib kahtlus, et esineb mittespetsiifilist mõju (näiteks sööda tarbimise ilmne vähenemine kohe alguses), võib lasta loomadel dooside manustamisega kohaneda enne kahe nädalast tupenõre äiete tegemise perioodi, millele järgneb paaritamine. Kui emasloomale kemikaali manustamist niimoodi pikendatakse (st neljanädalane dooside manustamine enne paaritumist), tuleks kaaluda nooremate loomade ostmist ja pikendada isasloomadele dooside manustamist enne paaritumist. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et vältida limaskestast kahjustamist ja seejärel pseudotiinuse teket (10, 11).
41. Tupenõre äieid tuleks uurida iga päev kõikide kohorti 1A kuuluvate F₁-põlvkonna emasloomade puhul pärast seda, kui tupp on avanenud, kuni leitakse esimene sarvestunud rakke sisaldav äie, et teha kindlaks ajavahemik nende kahe sündmuse vahel. Kõigi kohorti 1A kuuluvate F₁-põlvkonna emasloomade innatsükleid tuleks jälgida kahe nädala jooksul, alates umbes päevast PND 75. Lisaks sellele, kui F₁-põlvkonna paaritumine peaks olema vajalik, jälgitakse kohordi 1B tupe tsütoloogiat alates loomade paaridesse paigutamisest kuni kopulatsiooni tõendite saamiseni.

Paaritumine ja tiinus

42. Lisaks tavapärastele näitajatele (nt kehamass, sööda tarbimine, kliinilised tähelepanekud, sealhulgas surma ja haigestumuse kontroll) registreeritakse paaridesse paigutamise, eostamise ja poegimise kuupäev ning arvutatakse ühtimiseline ajavahemik (paaridesse paigutamisest kuni eostamiseni) ja tiinusaeg (eostamisest kuni poegimiseni). P-põlvkonna emasloomi tuleks hoolikalt uurida eeldatava poegimistähtaja ümbruses, et teha kindlaks poegimishäirete tunnused. Registreerida tuleks kõik pesaehituskäitumise või pesakonna eest hoolitsemise kõrvalekalded.
43. Poegimispäev võetakse imetamispäevaks 0 (LD 0) emasloomade puhul ja sünnijärgseks päevaks 0 (PND 0) järglaste puhul. Teise võimalusena võivad kõik võrdlused põhineda ühtimisjärgsel ajal, et vältida segadust sünnijärgse arengu kirjeldamisel, mis on tingitud erinevast tiinusajast; siiski tuleb registreerida ka poegimisel põhinev ajakava. See on eriti oluline, kui uuritav kemikaal mõjutab tiinuse kestust.

Järglaste näitajad

44. Iga pesakonda vaadeldakse nii ruttu kui võimalik pärast poegimist (PND 0 või 1), et kindlaks määrata poegade arv ja sugu, surnult sündinud, elussünnid ja kõik suuremad anomaaliad (väliselt nähtavad kõrvalekalded, sh suulaelõhe; nahaalused verevalumid; ebanormaalne naha värvus või tekstuur; nabaväadi olemasolu; piima puudumine maos; kuivanud eritiste esinemine). Lisaks peaks vastsündinute esimene kliiniline läbivaatus hõlmama kehatemperatuuri, aktiivsuse seisundi ja kättevõtmisele reageerimise kvalitatiivset hindamist. Poegi, kes leitakse surnult päeval PND 0 või hiljem, tuleks uurida, et teha kindlaks võimalikud puuded ja surma põhjus. Elusad pojad loetakse kokku ja kaalutakse üksikhaaval päeval PND 0 või 1 ja edaspidi korrapäraselt, näiteks päevadel PND 4, 7, 14 ja 21. Kliinilisi vaatlusi tuleks loomade vanust arvestades korrata järglaste kaalumise ajal või sagedamini juhul, kui vastsündinul

leiti mingeid konkreetseid puudeid. Täheldatavad tunnused võiksid muu hulgas hõlmata järgmist: välised anomaaliad, naha, karvastiku, silmade ja limaskestade muutused, eritiste ja väljaheidete esinemine ja autonoomse närvisüsteemi tegevuse muutused. Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad kättevõtmisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid või kummaline käitumine.

45. Iga poja anogenitaalne vahemaa (*anogenital distance*, AGD) tuleks mõõta vähemalt üks kord ajavahemikus PND 0–4. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normeerida poja suurst arvestava näitajaga, eelistatult kuupjuurega kehamassist (12). Isastel järglastel tuleks rinnanibude ja nibuväljakese olemasolu kontrollida päeval PND 12 või 13.
46. Kõiki väljavalitud F₁-põlvkonna loomi hinnatakse iga päev sugutiluki ja eesnaha eraldumise (isasloom) või tupe avanemise (emasloom) suhtes, alustades juba enne nende seksuaalse küpsuse näitajate saavutamise eeldatavat aega, et teha kindlaks varane seksuaalne küpsemine. Registreerida tuleks kõik suguorganite kõrvalekalded, nagu püsima jääv tupevahesein, kusiti alumise seina sulgumatus või peeniselõhe. F₁-põlvkonna loomade seksuaalset küpsust võrreldakse nende füüsilise arenguga, selleks määratakse vanus ja kehamass suguti ja eesnaha eraldumisel (isasloom) või tupe avanemisel (emasloom) (13).

Võimaliku arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse hindamine (kohordid 2A ja 2B)

47. Neurotoksilisuse hindamiseks kasutatakse 10 isas- ja 10 emaslooma kohordist 2A ning 10 isas- ja 10 emaslooma kohordist 2B igast doosirühmast (kumbagi kohorti lähevad 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; kõik on valitud juhuvalikuga). Kohordi 2A loomadel kontrollitakse helisignaali reageerimist, tehakse funktsionaalvaatluste kompleksi katsed, kontrollitakse motoorset aktiivsust (vt punktid 48–50) ja hinnatakse neuropatoloogiat (vt punktid 74–75). Tuleks püüda tagada, et kõikide katsetingimuste varieeruvus oleks võimalikult väike ja et ei oleks süstemaatilist viga mõne doosirühma suhtes. Muutujate hulgas, mis võivad käitumist mõjutada, on helivaljuse tase (nt katkendlik müra), temperatuur, niiskus, valgustus, lõhnad, kellaeg ja keskkonnapoolsed tähelepanu häirijad. Neurotoksikoloogiliste katsete tulemuste tõlgendamisel tuleks arvesse võtta asjakohaseid varasemaid kontrollrühmaga määratud võrdlusvahemikke. Kohordi 2B loomi tuleks kasutada neuropatoloogilisteks hindamiseks päeval PND 21 või 22 (vt punktid 74 ja 75).
48. Helisignaali katse tuleks teha päeval PND 24 (±1 päev), kasutades kohorti 2A kuuluvaid loomi. Katse tegemise päev peaks olema kõigi doosirühmade ja kontrollrühmade suhtes tasakaalustatud. Iga katsesessioon koosneb 50 katsest. Helisignaali katse tegemisel määratakse keskmine reaktsiooni amplituud igas 10-katselises plokis (10-katselisi plokkide on 5), kusjuures katsetingimusi optimeeritakse, et saavutada sessiooni jooksul toimuv harjumine. Katse tegemise kord peab olema kooskõlas katsemeetodiga B.53 (35).
49. Sobival ajal PND 63 ja PND 75 vahel korraldatakse kõikide kohordi 2A loomadega funktsionaalvaatluste kompleksi katsed ja automatiseeritud motoorse aktiivsuse katse. Nende katsete tegemise kord peab olema kooskõlas katsemeetoditega B.43 (33) ja B.53 (35). Funktsionaalvaatluste kompleks hõlmab looma välimuse, käitumise ja funktsioonide kahjustatuse põhjalikku kirjeldamist. Seda hinnatakse vaatluste järgi algul kodupuuris, pärast üleviimist vaatlemiseks standardväljakule (avamaa), kus loom liigub vabalt, ja manipuleerimiskatsetega. Katsetamine peaks toimuma järjekorras kõige vähem interaktiivsetelt katsetelt kõige interaktiivsematele. 1. liites on esitatud mõõdetavate näitajate loetelu. Kõiki loomi peaks hoolikalt jälgima koolitatud vaatleja, kes ei ole teadlik, mida igale loomale manustatakse, kasutades standarditud korda, et vähendada vaatlejaga seotud varieerumist. Võimaluse korral on soovitatav, et sama vaatleja hindaks kõiki sama katse loomi. Kui see ei ole võimalik, tuleb tõendada, et tulemused ei sõltu vaatlejast. Käitumiskatsete kompleksi iga näitaja puhul kasutatakse selgeid hindamisskaalasid ja punktide andmise kriteeriume. Võimaluse korral tuleks välja töötada objektiivsed kvantitatiivsed vaatlemisnäitajad, mis hõlmavad subjektiivset taseme määramist. Iga looma motoorset aktiivsust katsetatakse eraldi. Vaatlussessioon peab olema piisavalt pikk, et demonstreerida kemikaaliga töötlemata kontrollrühmas sessiooni jooksul tekkivat harjumist. Motoorset aktiivsust tuleks mõõta salvestusseadmega automaatselt aparaadi abil, millega saab määrata nii tegevuse hoogustumist kui ka vähenemist (nt tausttegevus, mida seadmega saab mõõta, ei tohiks olla nii vähene, et selle vähenemist ei õnnestu registreerida, ega nii hoogne, et selle edasist hoogustumist ei saa registreerida). Iga seadet tuleb kontrollida standardmeetodiga, et tagada, kuivõrd see on võimalik, eri seadmete mõõtmiste ja eri päeval toimuvate mõõtmiste usaldusväärsus. Doosirühmade loomad jaotatakse eri seadmete vahel võimalikult tasakaalustatult. Doosirühmade katsed peavad toimuma tasakaalustatult eri aegadel, et tulemusi ei mõjutaks tegevuse ööpäevased rütmid.
50. Kui olemasolev teave viitab vajadusele teha muid funktsionaalseid katseid (nt sensoorseid, sotsiaalseid, kognitiivseid), tuleks need lisada muudele uuringus tehtavatele hindamistele nii, et muid hindamisi ei häiritaks. Kui kõnealuseid katseid tehakse samade loomadega, keda kasutatakse standardses helisignaali katses, funktsionaalvaatluste

kompleksi katsetes ja motoorse aktiivsuse katsetes, tuleks kavandada erinevad katsed, et katsete kordumisest tulenev väärtulemuste oht viia miinimumini. Täiendavad uuringud võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused, oodatav mõju või toimetehhanism viitavad mingile konkreetsele neurotoksilise mõju tüübile.

Arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse võimalikkuse hindamine (kohort 3)

51. Päeval PND 56 (± 3 päeva) kasutatakse iga doosirühma kohordist 3 10 isas- ja 10 emaslooma (1 isas- ja 1 emasloom pesakonna kohta; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; loomad on valitud juhuslikult) T-raku-sõltuvate antikehade reaktsiooni katseks, milles uuritakse primaarset IgM-antikeha reaktsiooni T-raku-sõltuvale antigeenile, nagu lamba punaverelibled (SRBC) või meriteo *Megathura crenulata* hemotsüaniin (KLH), kooskõlas praeguste immuuntoksilisuse kindlakstegemise katse-eeskirjadega (14, 15). Reaktsiooni võib hinnata spetsiifiliste naaste moodustavate rakkude (*plaque-forming cells*, PFC) loendamise järgi SRBC- või KLH-spetsiifilise IgM-antikeha sisalduse määramise vereseerumis ELISA-analüüsiga reaktsiooni maksimumi ajal. Reaktsioon saavutab tavaliselt maksimumi neli (PFC-reaktsioon) või viis (ELISA) päeva pärast intravenooset immuniseerimist. Kui primaarset antikehareaktsiooni hinnatakse PFCde loendamise järgi, siis lubatakse loomade alarühmi hinnata eri päevadel järgmistel tingimustel: alarühma immuniseerimine ja surmamine on ajastatud nii, et PFCd loendatakse reaktsiooni maksimumis; alarühmades on võrdse hulga isas- ja emasjärglasi kõikidest doosirühmadest, kaasa arvatud kontrollrühmad, ning alarühmi hinnatakse ligikaudu samas sünnijärgses vanuses. Kokkupuudet uuritava kemikaaliga jätkatakse kuni päevani enne põrnade kogumist PFC-reaktsiooni määramiseks või seerumi võtmist ELISA-analüüsi jaoks.

Võimaliku reproduktiivtoksilisuse järeldamine (kohort 1B)

52. Kohordi 1B loomadele võib jätkata kemikaali manustamist pärast päeva PND 90 ja vajaduse korral lasta neil paari tuda, et saada F₂-põlvkond. Samasse doosirühma kuuluvad isas- ja emasloomad pannakse kokku (vältides pesakonnakaaslaste kokku elama panemist) kuni kaheks nädalaks ajavahemikul PND 90–120. Katse korraldus on samasugune kui P-põlvkonna puhul. Olenevalt saadavatest tulemustest võib siiski olla piisav, kui lõpetada katse päeval PND 4 ja mitte jätkata katset kuni võõrutamiseni või kauem.

VAATLUSED KATSE LÕPETAMISEL

Kliiniline biokeemia ja hematoloogia

53. Süsteemset mõju tuleks jälgida P-põlvkonna loomade puhul. Katse lõpetamisel võetakse paastuvereproovid iga doosirühma kümnest juhuvalikuga leitud P-põlvkonna isas- ja emasloomalt kindlaksmääratud kohast; proove säilitatakse asjakohastes tingimustes ning tehakse osaline või täielik hematoloogiline analüüs, kliinilis-biokeemiline analüüs, määratakse T4 ja TSH sisaldus või tehakse muud analüüsid, olenevalt uuritava kemikaali teadaolevast mõjuspektrist (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)). Tuleks määrata järgmised hematoloogilised näitajad: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv, vereliistakute arv ning hüübimisaja ja -võime. Vereplasmast või -seerumist tuleks määrata: glükoos, üldkolesterool, karbamiid, kreatiniin, üldvalk, albumiin ja vähemalt kaks hepatotsellulaarset mõju peegeldavat ensüümi (nt alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, leelisene fosfataas, γ -glutamüültranspeptidaas ja sorbitooldehüdrogenaas). Täiendavate ensüümide ja sapihapete mõõtmine võib teataval asjaoludel anda kasulikku teavet. Lisaks võib võtta kõikide loomade vere ja säilitada hilisemaks analüüsiks, et aidata selgitada ebaselget mõju või saada laborisisesid kokkupuudet käsitlevaid andmeid. Kui P-loomade teist paaritumist ei ole kavandatud, võetakse vereproovid vahetult enne ettenähtud surmamist või selle osana. Kui loomad jäetakse alles, kogutakse vereproovid paar päeva enne seda, kui loomad teist korda paaritatakse. Välja arvatud juhul, kui korduvdoosiuuringute andmed osutavad, et uuritav kemikaal ei mõjuta kõnealust näitajat, tuleks enne katse lõpetamist teha uriinianalüüs ja hinnata järgmised näitajad: uriini välimus, maht, osmolaalsus või erikaal, pH, valgusisaldus, glükoosisisaldus, vere ja vererakkude sisaldus, surnud rakud. Uriini võib koguda ka uuritava kemikaali ja/või metaboliitide eritumise jälgimiseks.
54. Süsteemset mõju tuleks jälgida ka F₁-põlvkonna loomade puhul. Katse lõpetamisel võetakse paastuvereproovid iga doosirühma kümnest juhuvalikuga leitud kohort 1A isas- ja emasloomalt kindlaksmääratud kohast; proove säilitatakse asjakohastes tingimustes ning tehakse tavaline kliinilis-biokeemiline analüüs, sealjuures määratakse kilpnäärmehormoonide T4 ja TSH sisaldus, tehakse hematoloogiline analüüs (leukotsüütide üld- ja suhtarv ning erütrotsüütide arv) ja uriinianalüüsid.

55. Liigsetele poegadele tehakse päeval PND 4 täielik lahkamine ning kaaluda tuleks kilpnäärmehormooni (T4) sisalduse mõõtmist vereseerumis. Vajaduse korral võib vastsündinute (PND 4) vereproovid koondada pesakondade kaupa biokeemiliste ja kilpnäärmehormoonide analüüside tegemiseks. Hormoonide T4 ja TSH määramiseks kogutakse veri ka võõrutatud poegadelt, kellele tehakse täielik lahkamine päeval PND 22 (F₁-põlvkonna pojad, keda ei valitud kohortidesse).

Sperma näitajad

56. Sperma näitajad mõõdetakse kõikidel P-põlvkonna isasloomadel, kui 90-päevase katsega ei ole kindlaks tehtud, et uuritav kemikaal sperma näitajaid ei mõjuta. Sperma näitajad tuleks määrata kõikidel kohordi 1A isasloomadel.
57. Surmamisel registreeritakse kõikide P- ja F₁-põlvkonna (kohordi 1A) isasloomadel munandite ja munandimanuste mass. Vähemalt üks munand ja üks munandimanus säilitatakse histopatoloogiliseks uuringuks. Ülejäänud munandimanus kasutatakse munandimanuse sabas sisalduvate spermavarude määramiseks (16, 17). Lisaks kogutakse seemnerakkude kahjustamist vältivate meetoditega munandimanuse sabas või seemnejuhas olev sperma seemnerakkude liikuvuse ja morfoloogia hindamiseks (18).
58. Seemnerakkude liikuvust saab hinnata kohe pärast surmamist või hilisemaks analüüsiks säilitatud spermas. Liikumisvõimeliste seemnerakkude protsenti võib määrata subjektiivselt või objektiivselt liikumist analüüsiva arvuti-programmiga (19, 20, 21, 22, 23, 24). Seemnerakkude morfoloogia hindamiseks tuleb munandimanusest (või seemnejuhas) võetud spermaproovi kõigepealt vaadelda fikseeritud või märgpreparaadis (25) ning iga proovi kohta vähemalt 200 spermatoosoidi tuleb klassifitseerida kas normaalseks (nii pea kui ka keskosa/saba on normaalse välisusega) või ebanormaalseks. Sperma morfoloogiliste kõrvalekallete näideteks on kokkusulamine, isoleeritud pead ning peade ja/või sabade väärmoodustised (26). Väärmoodustistega või suure peaga seemnerakud võivad osutada spermatogeneesi häiretele.
59. Kui lahkamise ajal on spermaproovid külmutatud, äged fikseeritud ja seemnerakkude liikuvuse analüüs salvestatud (27), võib edasisel analüüsil piirduda kontrollrühma ja suure doosi rühma isasloomadega. Kui täheldatakse kemikaali manustamisest tingitud mõjusid, tuleks siiski hinnata ka väiksema doosi rühmasid.

Täielik lahang

60. Katse lõpetamisel või loomade enneaegse surma puhul lahatakse kõik P- ja F₁-põlvkonna loomad ning uuritakse makroskoopiliselt struktuuriliste kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Surmaeelses seisundis humaanselt surmatud või surnud pojad tuleks registreerida ja (kui nende laibad ei ole matseerunud) nende laipu uurida võimalike puuete leidmiseks ja/või surmapõhjuse selgitamiseks; nende laibad tuleks säilitada.
61. Täiskasvanud P- ja F₁-põlvkonna emasloomadel uuritakse tupenõre äiet lahkamise päeval, et teha kindlaks innatsükli staadium ning leida korrelatsioonid suguelundite histopatoloogiaga. Kõikide P-emasloomade (ja F₁-põlvkonna emasloomade, kui see on kohaldatav) emakat uuritakse pesastumiskohtade olemasolu ja arvu määramiseks viisil, mis ei sega histopatoloogilist hindamist.

Elundite mass ja kudede säilitamine — täiskasvanud P- ja F₁-põlvkonna loomad

62. Katse lõpetamise ajal määratakse kõigi P-põlvkonna loomade ja kõigi täiskasvanud F₁-põlvkonna asjakohastes kohortidesse (kirjeldatud allpool) kuuluvate loomade kehamass ja kõikide allpool loetletud organite märgmass nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Need organid tuleks säilitada sobivates tingimustes. Kui ei ole öeldud teisiti, võib paariselundid kaaluda eraldi või koos, vastavalt katset tegeva labori tavale.

— Emakas (koos munajuhade ja emakakaelaga, munasarjad);

— munandid, munandimanused (kokku ja munandimanuse sabad, mida kasutatakse seemnerakkude loendamiseks);

— eesnääre (dorsolateraalne ja ventraalne osa koos). Eesnäärmekompleksi puhastamisel naaberkudedest tuleb hoolikalt vältida vedelikuga täidetud seemnepõiekestest vigastamist. Kui eesnäärme üldmassi määramisel tuleb nentida käsitlemise mõju, tuleb eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne segment pärast fikseerimist hoolikalt välja lõigata ja kaaluda eraldi;

- seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäarmete ja nendes olevate vedelikega (tervikuna);
 - aju, maks, neerud, süda, põrn, harkelund, ajuripats, kilpnääre (pärast fikseerimist), neerupealised ja teadaolevad sihtorganid või -koed.
63. Lisaks eespool loetletud elunditele tuleks võtta ja säilitada sobivates tingimustes järgmiste elundite proovid: perifeersed närvid, lihased, seljaaju, silmad ja nägemisnärv, seedetrakt, kusepõis, kopsud, hingetoru koos kilpnäärme ja kõrvakilpnäärmetega, luuüdi, seemnejuha (isasloomad), rinnanäärmed (isas- ja emasloomad) ja tupp.
64. Määratakse kõigi kohordi 1A loomade elundite mass ja elundid konserveeritakse histopatoloogiliste uuringute jaoks.
65. Sünnieelselt ja -järgselt tekitatud immuuntoksiliste mõjude uurimiseks kasutatakse iga doosirühma kohordist 1A 10 isas- ja 10 emaslooma (1 isas- ja 1 emasloom pesakonna kohta; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; loomad on valitud juhuslikult), kellel pärast projekti lõpetamist:
- kaalutakse manustamisviisiga seotud lümfisõlmed ja kokkupuutetest kaugemal asetsevad lümfisõlmed (lisaks neerupealiste, harkelundi ja põrna massi määramisele, mis on tehtud juba kõikidele kohort 1A loomadele);
 - tehakse põrna lümfotsüütide alampopulatsiooni analüüs (CD4+ ja CD8+ T-lümfotsüüdid, B-lümfotsüüdid ja looduslikud tapjarakud (NK-rakud); selleks kasutatakse pool põrna, teine pool põrna säilitatakse histopatoloogiliseks hindamiseks.
- Immuniseerimata (kohordi 1A) loomade põrna lümfotsüütide alampopulatsioonide analüüsiga tehakse kindlaks, kas kokkupuude kemikaaliga on muutnud helperrakkude (CD4+) või tsütotoksiliste (CD8+) harkelundipäritoluga lümfotsüütide või looduslike tapjarakkude (NK-rakud) arvukust immunoloogilises püsiolekus (nimetatud rakud tagavad kiire reageerimise vähirakkudele ja haigusetekitajatele).
66. Kohort 1B loomadel tuleb kaaluda järgmised elundid ja töödelda asjaomased koed plokkpreparaatideks:
- tupp (kaalumata);
 - emakas koos emakakaelaga;
 - munasarjad;
 - munandid (vähemalt üks);
 - munandimanused;
 - seemnepõiekesed koagulatsiooninäärmed;
 - eesnääre;
 - ajuripats;
 - kindlakstehtud sihtorganid.

Kohordi 1B loomadele tehakse histopatoloogiline uuring, kui kohordi 1A tulemused on ebaselged või oletatakse reproduktiivtoksilisust või siseseretsioonisüsteemi kahjustavaid omadusi.

67. Kohordid 2A ja 2B: arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katsed (PND 21–22 ja täiskasvanud järglased). Kohordi 2A loomad surmatakse pärast käitumuslikke katseid, määratakse aju mass ja tehakse täielik neurohistopatoloogiline analüüs neurotoksilisuse hindamiseks. Kohordi 2B loomad surmatakse päeval PND 21 või 22, määratakse aju mass ja tehakse aju mikroskoopiline läbivaatus neurotoksilisuse hindamiseks. Kohordi 2A puhul on vajalik fikseerimine perfusiooniga; kohordi 2B loomade puhul on see valikuline, nagu on ette nähtud katsemeetodis B.53 (35).

Elundite mass ja kudede säilitamine — F₁-põlvkonna võõrutuseas loomad

68. Pojad, keda ei ole valitud kohortidesse, seejuures kängujäänud pojad, surmatakse päeval PND 22, kui tulemused ei osuta täiendava elupuhuse uurimise vajadusele. Surmatud pojad lahatakse, mille käigus hinnatakse suguorganeid, nagu on kirjeldatud punktides 62 ja 63. Iga doosirühma kummastki soost kuni 10 pojal võimalikult paljudest pesakondadest määratakse aju, põrna ja harkelundi mass ja nimetatud elundid säilitatakse sobivates tingimustes. Lisaks sellele võib osutatud isastel ja emastel poegadel säilitada rinnanäärme koed hilisemaks mikroskoopiliseks analüüsiks⁽¹⁾ (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)). Selgelt nähtavad väärarendid ja sihtkoed tuleks säilitada võimaliku histoloogilise uuringu jaoks.

⁽¹⁾ Uuringud on näidanud, et rinnanäärme, eriti varases nooruses toimuv rinnanäärme areng, on tundlik östrogeense toime näitaja. On soovitatav, et käesolevas katsemeetodis nähtaks ette noorte kummastki soost poegade rinnanäärmete uurimine pärast seda, kui see on valideeritud.

Histopatoloogiline uuring — P-põlvkonna loomad

69. Kõikidel suure doosi ja kontrollrühmade P-põlvkonna loomadel tuleks teha kõikide punktides 62 ja 63 osutatud elundite täielik histopatoloogiline uuring. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutustega elundeid tuleks samuti uurida kõikidel väiksema doosiga rühmade loomadel, et määrata NOAEL (tähtsatat kahjulikku toimet mitte-avaldav doos). Lisaks sellele tuleks loomadel, kellel kahtlustatakse vähenenud viljakust, nt nendel, kellel ei õnnestunud paarituda, viljastuda, sigitada või sünnitada terveid järglasi, või nendel, kelle innatsükkel või sperma hulk, liikuvus või morfoloogia olid muutunud, uurida suguelundeid ning kõiki suuremaid kahjustusi tuleks hinnata histopatoloogiliselt.

Histopatoloogiline uuring — F₁-põlvkonna loomad*Kohordi 1 loomad*

70. Kõikidel suure doosi ja kontrollrühmade täiskasvanud kohordi 1A loomadel tuleks teha kõikide punktides 62 ja 63 osutatud elundite täielik histopatoloogiline uuring. Iga pesakonda peaks esindama vähemalt 1 järglane kummastki soost. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutuste ja nähtavate kahjustustega elundeid ja kudesid tuleks samuti uurida kõikidel väiksema doosi rühmade loomadel, et määrata NOAEL. Selleks, et hinnata sünnieelse ja -järgse kokkupuute põhjustatud mõjusid lümfisüsteemi organitele, tuleks samuti hinnata kogutud lümfisõlmede ja luuüdi histopatoloogiat kohordi 1A 10 isas- ja 10 emasloomal, lisaks kõikidel 1A-loomadel juba tehtavatele harkelundi, põrna ja neerupealiste histopatoloogilistele hindamistele.
71. Kohordi 1B kõikide loomade suguorganite ja sisesekretsiooninäärmete kudesid, mis on töödeldud plokkpreparaadiks, nagu on kirjeldatud punktis 66, tuleks uurida histopatoloogia suhtes juhtudel, kui kahtlustatakse reproduktiivtoksilist või sisesekretsioonisüsteemi kahjustavat mõju. Kohordi 1B loomadel tuleks teha ka histoloogiline uuring, kui kohordi 1A tulemused on ebaselged.
72. Täiskasvanud emasloomade munasarjad peaksid sisaldama esmaseid ja kasvavaid folliikuleid, samuti kollaskehi; seepärast tuleks F₁-emasloomadel püüda histopatoloogilise uurimisega kvantitatiivselt hinnata esmaseid ja väikseid kasvavaid munarakke, samuti kollaskehi; loomade arv, munasarjalõigete valik ja lõikeproovi suurus peaksid statistiliselt sobima kasutatava hindamisprotseduuriga. Folliikulite loendamise võib kõigepealt teha kontrollrühma ja suure doosi rühma loomadel, ning kui viimasel juhul leitakse kahjulikku mõju, siis uurida väiksema doosi rühmi. Uurimisel tuleks arvutada esmaste folliikulite arv, millele saab liita väikeste kasvavate folliikulite arvu, et võrrelda doosirühma ja kontrollrühma kuuluvate emasloomade munasarju (vt OECD juhenddokument 151 (40)). Kollaskehade hindamine peaks toimuma paralleelselt innatsükli staadiumi määramisega, nii et tsükli staadiumi saaks hindamisel arvesse võtta. Munajuhade, emaka ja tupe puhul uuritakse vastavale organile omast arengut.
73. F₁-isasloomadel uuritakse üksikasjalikult munandite histopatoloogiat, et teha kindlaks kemikaaliga kokkupuutest tingitud mõjud kudede diferentseerumisele munandis, munandi arengule ja spermatogeneesile (38). Võimaluse korral tuleks uurida *rete testis*e lõikeid. Munandimanuse pead, keha ja saba ning seemnejuha uuritakse vastavale organile omase arengu suhtes, samuti uuritakse P-isasloomade puhul nõutavaid näitajaid.

Kohordi 2 loomad

74. Pärast neurokäitumuslike katsete lõpetamist (pärast päeva PND 75, kuid mitte hiljem kui PND 90) tehakse kõikidele suure doosi ja kontrollrühmade kohordi 2A kummastki soost loomadele neurohistopatoloogilised uuringud. Aju histopatoloogiline uuring tehakse kõikidel suure doosi ja kontrollrühmadesse kuuluvatel kohordi 2B kummastki soost loomadel päeval PND 21 või 22. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutustega elundeid või kudesid tuleks samuti uurida väiksema doosi rühmade loomadel, et määrata NOAEL (tähtsatat kahjulikku toimet mitteavaldav doos). Kohortide 2A ja 2B loomade puhul uuritakse mitut aju lõiget, et uurida haistmissibulaid, ajukoort, hipokampi, basaalganglione, talamust, hüpotalamust, keskaju (*tectum*, *tegmentum* ja ajuvarred), ajutüve ja väikeaju. Ainult kohordi 2A puhul uuritakse silmi (võrkkest ja nägemisnärv) ja perifeerset närvid, lihaste ja seljaaju proove. Kõik neurohistoloogilised määramised tehakse kooskõlas katsemeetodiga B.53 (35).
75. Morfomeetrilised (kvantitatiivsed) hindamised tuleks teha aju tüüpilistes piirkondades (usaldusväärsete mikroskoopiliste märkide järgi valitakse hoolikalt homoloogsed lõiked) ning need hindamised võivad hõlmata konkreetsete ajupiirkondade joonmõõtmete või pindala mõõtmist. Iga iseloomuliku koha tasandilt võetakse vähemalt kolm järjestikust lõiget, et valida hindamiseks konkreetse ajuosa kõige homoloogsem ja tüüpilisem lõige. Neuropatoloogil peaks olema eksperdi otsustusvõimet, kui ta otsustab, kas mõõtmiseks valmistatud lõiked on homoloogsed

muude lõigetega samade proovide hulgas ja kas neid seepärast on sobiv võtta võrdlemiseks, kuna eelkõige joonmõõtmised võivad muutuda juba väikse vahemaa juures (28). Mittehomoloogseid lõikeid ei tohiks kasutada. Kuigi eesmärk on võtta proovid kõigilt selleks ettenähtud loomadelt (10/sugu/doositase), võib piisata ka väiksemast arvust. Vähem kui 6 loomalt/sugu/doositase võetud proovidest tavaliselt siiski ei piisa käesoleva katsemeetodi puhul. Et tuvastada kemikaaliga kokkupuute mõju sellistele näitajatele nagu teatava neuroanatomilise piirkonna maht või rakkude arv, võib kasutada stereoloogiat. Koenäidiste ettevalmistamisel tuleks kõikidel etappidel — kudede perfusioon, koeproovide väljalõikamine, kudede töötlemine ja mikroskoobipreparaatide värvimine — kasutada tasakaalustatud katsekorraldust, nii et igas partiis oleks iga doosirühma esindav valim. Kui kasutatakse morfoomeetrilist või stereoloogilist analüüsi, tuleks kõikide doosirühmade ajukoed panna sobivasse fikseerivasse keskkonda samaaegselt, et vältida pikaajalisel fiksiitivis hoidmisel ajukoe kokkutõmbumisega seotud artefakte.

UURINGU PROTOKOLL

Andmed

76. Andmed esitatakse eraldi ja tabelisse kokkuvõetuna. Iga doosirühma ja iga põlvkonna kohta tuleks võimaluse korral teatada järgmised andmed: loomade arv katse alguses, katse ajal surnuna leitud või humaanselt surmatud loomade arv, iga looma surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, poeginud emasloomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv. Tuleks teatada ka mürgistuse tunnuste kirjeldus, sealhulgas avaldumise aeg, kestus ja raskus.
77. Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata sobiva ja heakskiidetud statistilise meetodi abil; Statistilised meetodid tuleks valida juba uuringu kavandamisel ja nendega tuleks asjakohaselt arvesse võtta muid kui normaaljaotusega andmeid (nt loendusandmed), piiratud andmeid (nt piiratud vaatlusaeg), muudest andmetest sõltuvaid andmeid (nt pesakonna mõju, korduvad mõõtmised), ja ebavõrdset dispersiooni. Üldistatud lineaarsed segamudelid ning doosi ja toime vahelise sõltuvuse mudelid hõlmavad laia klassi analüütilisi vahendeid, mis võivad olla asjakohased käesoleva katsemeetodi alusel saadud andmete töötlemisel. Protokollis tuleb esitada piisavalt teavet analüüsimeetodi kohta ja kasutatud arvutiprogrammi kohta, nii et sõltumatu kontrollija/statistik võib hinnata ja uuesti hinnata analüüsi.

Tulemuste hindamine

78. Tulemusi tuleks hinnata täheldatud mõjude suhtes, kaasa arvatud lahangu- ja mikroskoopilised leiud. Hindamisega tehakse kindlaks, kas on olemas seos doosi ja kõrvalekallete, nende esinemissageduse ja raskusastme, sealhulgas silmaga täheldatavate kahjustuste vahel või sellist seost ei ole. Hinnata tuleb ka mõju sihtorganitele, viljakusele, kliinilistele kõrvalekalletele, paljunemiskäitumisele ja pesakonna eest hoolitsemisele, kehamassi muutusi, suremust ja muid mürgistusega seotud ja arengumõjusid. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sooga seotud muutustele. Katsetulemuste hindamisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalise-keemilisi omadusi ja võimaluse korral toksiko-kineetilisi andmeid, sh uuritava kemikaali läbipääsemist platsentast ja eritumist piimaga.

Katseprotokoll

79. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave, mis on saadud käesolevas uurimuses P-, F₁- ja F₂-loomadega (vajaduse korral).

Uuritav kemikaal:

- kogu asjakohane kättesaadav teave uuritava kemikaali ja selle keemiliste, toksiko-kineetiliste ja toksikodünaamiliste omaduste kohta;
- tunnusandmed;
- puhtus.

Kandaine (vajaduse korral):

- kandaine valiku põhjendamine, kui kandaine ei ole vesi.

Katseloomad:

- kasutatud liik/aretusliin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, sööt, pesamaterjalid jne;
- iga looma mass katse alguses;
- P-emasloomade tupeäige andmed enne kemikaali manustamise algust (kui andmeid kogutakse sel ajal);
- P-põlvkonna isas- ja emasloomade paaritamise tulemused, näidatakse isas- ja emasloom ning paaritumise edukus;
- andmed F₁-põlvkonna täiskasvanud loomade pesakonnapäritolu kohta.

Katsetingimused:

- doositaseme valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali valmistise/söödavalmistise üksikasjad, saavutatud kontsentratsioonid;
- uuritava kemikaali stabiilsus kandeainega saadud valmistises, valmistise homogeensus (nt sööt, joogivesi), veres ja/või piimas kasutustingimustes ja säilitamisel eri kasutuskordade vahel;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- sööda/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) teisendus tegelikuks doosiks (mg kehamaassi kg kohta päevas), vajaduse korral;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda koostis, kui see on teada);
- poegade surmamiseks ja katserühmadesse määramiseks juhusliku valimise korra üksikasjalik kirjeldus;
- keskkonnatingimused;
- uuringust osavõtnute loetelu koos väljaõppe näitamisega.

Tulemused (kokkuvõte ja individuaalsed andmed sugude ja dooside kaupa):

- sööda tarbimine, vee tarbimine, kui see on teada, söödakasutuse tõhusus (kehamassi lisandumine tarbitud sööda grammi kohta, välja arvatud paaritamisperioodil ja imetamise ajal) ning uuritava kemikaali tarbimine (sööda või joogiveega manustamise puhul) P- ja F₁-põlvkonna loomade puhul;
- andmed omastamise kohta (kui on mõõdetud);
- P-loomade kehamassi andmed;
- valitud F₁-põlvkonna loomade võõrutusjärgsed kehamassi andmed;
- surmaaeg katse ajal või andmed loomade ellujäämise kohta kuni surmamiseni;
- kliiniliste leidude laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas kahjustused on pöörduvad või mitte);
- vereanalüüsi, uriinianalüüsi ja kliinilise keemia andmed, sealhulgas TSH ja T4;
- põrnarakkude fenotüübianalüüsi tulemused (T-, B-, NK-rakud);
- luuüdi rakuline koostis;
- mürgise toime andmed;
- P- ja F₁-põlvkonna emasloomade arv, kellel on normaalne või ebanormaalne innatsükkel ja tsükli kestus;
- aeg kuni paaritumiseni (koituseelne ajavahemik, päevade arv kokku paigutamise ja paaritumise vahel);
- toksilised või muud mõjud paljunemisele, sealhulgas selliste loomade arv ja osakaal, kellel toimus paaritumine, tiinestumine, sünnitamine ja imetamine; tiinuse esilekutsunud isasloomade arv ja osakaal, poegimisraskustega, pika või raske poegimisega emaste arv ja osakaal;
- tiinuse kestus ja, kui võimalik, poegimise kestus;
- pesastumiste arv, pesakonna suurus ja isasloomade protsent poegade hulgas;

- pärast pesastumist toimunud abortide, elussündide ja surnutsündinute arv ja protsent;
- pesakonna ja poegade massi andmed (isased, emased ja koos), kängunud järglaste arv, kui see määrati;
- selgelt nähtavate arenguhälvetega poegade arv;
- mürgistuse või muud mõjud järglastele, sünnijärgsele kasvule, elujõulisusele jne;
- andmed poegade füüsilise arengu järkude kohta ja muud sünnijärgse arengu andmed;
- F₁-põlvkonna loomade suguküpsuse saabumise andmed;
- andmed poegade ja täiskasvanud loomade funktsionaalsete leidude kohta;
- andmed P- ja täiskasvanud F₁-põlvkonna loomade kehamassi kohta surmamisel ning elundite täieliku ja suhtelise massi kohta;
- lahkamise leiud;
- kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- P- ja F₁-põlvkonna isasloomade munandimanuse sabaosas olevate spermatoosidide koguarv, edasiliikuvate spermatoosidide protsent, morfoloogiliselt normaalsete spermatoosidide protsent ning tuvastatud kõrvalekaldega spermatoosidide protsent;
- P- ja F₁-põlvkonna emasloomade munasarjades olevate eri küpsemisstaadiumides folliikulite arvud, kui see on kohaldatav;
- F₁-põlvkonna emasloomade kollaskehade loendamise andmed;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Kohordi 2 näitajad:

- üksikasjalik meetodi kirjeldus: kuidas standarditi tähelepanekud ja protseduurid, samuti märgatud nähtustele hindepunktide andmise tööjuhendid;
- kõikide katses kasutatud meetodite loetelu ja nende kasutamise põhjendused;
- kõikide kasutatud käitumuslike, funktsionaalsete, patoloogia-, neurokeemia- või elektrofüsioloogiameetodite üksikasjad, sealhulgas teave automaatseadmete kohta;
- seadmete kalibreerimise meetodid, seadmete samaväärsuse tagamine ja doosirühmade tasakaalustatud jaotamine katsete tegemisel;
- lühike selgitus kõigi otsuste kohta, milles kasutati eksperdi hinnanguid;
- kõikide käitumisega seotud, funktsionaalsete, neuropatoloogiliste ja morfomeetriliste leidude üksikasjalik kirjeldus sugude kaupa, sealhulgas nii suurenemised kui ka vähenemised, võrreldes kontrollrühmadega;
- aju mass;
- neuroloogiliste tunnuste põhjal pandud diagnoosid ja oletatud kahjustused, sealhulgas looduslikult esinevad haigused või haigusseisundid;
- tüüpiliste leidude kujutised;
- madala lahutusvõimega kujutised, et oleks võimalik hinnata morfomeetriaks kasutatud lõigete homoloogsust;
- tulemuste statistiline analüüs koos andmete analüüsiks kasutatud statistiliste mudelitega ja tulemused, sõltumata sellest, kas need olid olulised või mitte;
- muude toksiliste mõjude (sugude ja doosirühmade kaupa) seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;
- toksiko-kineetilise teabe mõju järeldustele;
- andmed, mis kinnitavad katsemeetodi usaldusväärsust ja tundlikkust (st positiivsed ja varasemad kontrolli andmed);
- seosed neuropatoloogilise ja funktsionaalse mõju vahel, kui on seoseid;
- NOAEL või võrdlusdoos emaloomade ja järglaste puhul, sugude ja rühmade kaupa;
- tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav neurotoksiline aine, ja täheldatava kahjuliku toimeta doos.

Kohordi 3 näitajad:

- seerumi IgM-antikehade tiitrid (SRBC või KLH suhtes ülitundlikkuse tekkimine) või põrna IgM PFC ühikud (SRBC suhtes ülitundlikkuse tekkimine);
- T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katse (*T-cell dependant antibody response assay*, TDAR) korrektset läbiviimist tuleks kinnitada optimeerimise protsessi osana, kui labor teeb seda katset esimest korda, ja regulaarselt (nt igal aastal) kõikide laborite puhul;
- tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav immuuntoksiline aine, ja täheldatava kahjuliku toimeta doos.

Tulemuste arutelu.

Järeldused, sh NOAEL-väärtused mõjude kohta emadele ja järglastele

Samuti tuleks esitada kogu muu teave, mida ei saadud uuringu käigus, kuid mis abistab tulemuste tõlgendamist (nt mõju sarnasus muude teadaolevalt neurotoksiliste ainete mõjuga).

Tulemuste tõlgendamine

80. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring annab vajaduse korral teavet selle kohta, kuidas korduv kokkupuude kemikaaliga mõjutab reproduktiivtsükli kõiki etappe. Eelkõige annab uuring teavet reproduktiivsüsteemi ja järglaste arengu, kasvu, eluvõime ja funktsionaalsete näitajate kohta kuni päevani PND 90.
81. Tulemuste tõlgendamisel tuleb arvesse võtta kogu senist teavet uuritava kemikaali kohta, sealhulgas kemikaali füüsikalise-keemilisi, toksikokeemilisi ja -dünaamilisi omadusi, asjakohast teavet struktuurianaloogide ning varasemate mürgisuse uuringute kohta (nt äge mürgisus, korduvdoosi mürgisus, mehhaanilised uuringud ja uuringud, millega kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt hinnatakse *in vivo* ja *in vitro* metabolismi sõltuvust bioloogilisest liigist). Üldise lahangu ja elundite kaalumise tulemusi tuleks hinnata muudes, korduvate annustega uuringutes tehtud vaatluste kontekstis, kui see on teostatav. Järglaste kasvu vähenemist võib vaadelda seoses uuritava kemikaali mõjuga piima koostisele (29).

Kohort 2 (arenguhäireid põhjustav neurotoksilisus)

82. Neurokäitumuslikke ja neuropatoloogilisi tulemusi tuleks tõlgendada kõikide tehtud tähelepanekute kontekstis, kasutades tõendite kaalukuse lähenemisviisi ja eksperdiarvamust. Arutada tuleks käitumuslike ja morfoloogiliste leidude tüüpe ning doosi ja toime vahelist sõltuvust. Kõnealuses arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse iseloomustuses tuleks hinnata inimeste epidemioloogilisi uuringuid või juhtumiaruandeid, katseloomade uuringuid (nt toksiko-kineetilisi andmeid, struktuuri-aktiivsuse sõltuvusi, muid toksikoloogiauuringu andmeid). Andmete hindamisel tuleks arutada nii bioloogilist kui ka statistilist tähtsust. Hindamisel tuleks vaadelda neuropatoloogiliste ja käitumuslike muutuste vahelist seost, kui täheldati mingeid muutusi. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse tulemuste tõlgendamise suunised vt katsemeetod B.53 (35) ja Tyl *et al.*, 2008 (31).

Kohort 3 (arenguhäireid põhjustav immuuntoksilisus)

83. Immuunsüsteemi funktsiooni allasurumist või tugevdamist, mida mõõdetakse TDAR-meetodiga (T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katse), tuleks hinnata kõigi muude tähelepanekute kontekstis. TDAR-meetodi tulemuste olulisust võivad toetada muud immunoloogiaga seotud näitajad (nt luuüdi rakuline koostis, lümfikudede mass ja histopatoloogia, lümfotsüüdi populatsioonide suhtarvud). TDAR-meetodiga kindlakstehtud mõju ei pruugi olla väga oluline, kui juba madalama doosiga kokkupuute juures esineb muid mürgisuse tunnuseid.
84. Reproduktiivtoksilisuse ja neurotoksilisuse tulemuste tõlgendamisel tuleks vaadata OECD juhenddokumenti nr 43 (26).

KIRJANDUS

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

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

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

1. liide

Mõõtmised ja vaatlused, mis kuuluvad funktsionaalvaatluste kompleksi (kohort 2A)

Kodupuur ja avamaa	Manipuleerimiskatsed	Füsioloogilised näitajad
Asend	Äravõtmise kergus	Temperatuur
Tahtmatud kloonilised ja toonilised krambid	Kättevõtmise kergus	Kehamass
Silmade sulgemine	Lihaste toonus	Pupilli reaktsioon
Turris karv	Reaktsioon lähenemisele	Pupilli suurus
Süljevool	Reaktsioon puudutusele	
Pisaravool	Helisignaalile reageerimine	
Häälitsused	Reaktsioon saba näpistamisele	
Järglaste hooldamine	Reaktsioon asendi muutmisele	
Kõnnaku kõrvalekalded	Tagajalgade laialiajamine kukutamisel	
Erutus	Esikäpa haardetugevus	
Stereotüüpne käitumine	Tagakäpa haardetugevus	
Kummaline käitumine		
Mäardumine		
Hingamise kõrvalekalded		

2. liide

MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

B.57. H295R STEROIDOGENEESI KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 456 (2011). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et söeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid. OECD 2002. aasta kontseptuaalses raamistikus sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide katsetamiseks ja hindamiseks on viis taset; igale tasemele vastab erinev bioloogilise keerukuse tase (1). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vitro* H295R-steroidogeneesi katses (H295R) on kasutatud inimese neerupealisevähi rakuliini (NCI-H295R-rakud) ja see vastab 2. taseme „*in vitro* katsele, millega saadakse mehhanistlike andmeid”, mida kasutatakse sõelumiseks ja selleks, et tunnustada kemikaal erilist tähelepanu nõudvaks. Katse väljatöötamine ja standardimine sõelkatseks, mille abil saaks avastada kemikaalide poolt steroidogeneesi, eriti 17 β -östradiooli (E2) and testosterooni (T) sünteesile avaldatavat mõju, toimus mitmeastmelise protsessina. H295R-katse on optimeeritud ja valideeritud (2, 3, 4, 5).
2. H295R steroidogeneesi katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad E2 ja T sünteesi. H295R-katse on ette nähtud selliste ksenobiootikute leidmiseks, mis mõjutavad raku endogeenseid komponente, millest koosneb kolesteroolist E2 ja/või T sünteesini viiv rakusisene biokeemiline sünteesirada. H295R-katse ei ole ette nähtud selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis mõjutavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telje kaudu. Katse eesmärk on saada vastus JAH või EI küsimusele, kas kemikaal võib esile kutsuda või pärssida T ja E2 sünteesi; mõnel juhul võib saada aga ka kvantitatiivse tulemuse (vt punktid 53 ja 54). Katse tulemused väljendatakse hormoonide sünteesi suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga. Katse eesmärk ei ole saada konkreetset mehhanismi käsitlevat teavet, kuidas uuritav kemikaal mõjutab sisesekretsioonisüsteemi. Teadlased on uurinud kõnealuse rakuliini abil mõju konkreetsetele ensüümidele ja vahepealsete hormoonide nagu progesterooni sünteesile (2).
3. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud liites. Üksikasjalik katse-eeskiri, kuidas valmistada lahuseid, kasvatada rakke ja teha muid katse läbiviimiseks vajalikke töid, on esitatud OECD dokumendi „Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production” (4) I–III liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Steroidsete suguhormoonide sünteesis osalevad viis ensüümi, mis katalüüsivad kuue steroidse suguhormooni biosünteesi. Kolesterooli ensümaatiline muundamine pregnenolooniks kolesterooli kõrvalahelat lõhustava tsütokroom P450 (CYP) ensüümi (CYP11A) poolt on steroidsete lõppsaadusteni viiva biokeemiliste reaktsioonide rea esimene etapp. Olenevalt kahe järgmise reaktsiooni järgust hargneb steroidogeenne rada kaheks rajaks, need on Δ^5 -hüdroksüsteroidide rada ja Δ^4 -ketosteroidide rada, mis ühinevad taas androsteendiooni sünteesi juures (joonis 1).
5. Androsteendioon muudetakse 17 β -hüdroksüsteroididehüdrgenaasi (17 β -HSD) poolt testosterooniks (T). Testosteroon on nii vahesaadus kui ka lõpphormoonisaadus. Isaslooma organismis võib 5 α -reduktaas muundada testosterooni (T) dihüdrotestosterooniks (DHT); 5 α -reduktaasi leidub androgeenide sihtkudedes, nagu eesnäärse ja seemnepõiekesed, rakumembraanides, tuumaümbrises ja endoplasmaatilises retiikulumis. DHT on oluliselt tugevam androgeen kui T ja seda peetakse samuti lõpphormoonisaaduseks. H295R-katse abil ei mõõdetata DHT-d (vt punkt 10).
6. Steroidogeenne raja ensüüm, mis muundab androgeensed kemikaalid östrogeenseteks kemikaalideks, on aromataas (CYP19). CYP19 muundab testosterooni (T) 17 β -östradiooliks (E2) ja androsteendiooni östrooniks. Hormoone E2 ja T peetakse steroidogeenne raja lõppsaadusteks.
7. CYP17 lüaasse aktiivsuse spetsiifilisus vahepealsete substraatide suhtes oleneb loomaliigist. Inimesel eelistab see ensüüm Δ^5 -hüdroksüsteroidide raja substraate (pregnenolooni), samal ajal kui roti puhul on eelistatud Δ^4 -ketosteroidide raja substraadid (progesteroon) (19). Sellised erinevused CYP17 lüaases aktiivsuses võivad selgitada mõningaid liigist sõltuvaid erinevusi *in vivo*-reaktsioonis steroidogeneesi mõjutavatele kemikaalidele (6). On näidatud, et H295R-rakud peegeldavad väga hästi täiskasvanud inimese neerupealise ensüümide ekspressiooni ja steroidide sünteesi (20), kuid nendes on ekspresseeritud androgeenide sünteesi nii Δ^5 -hüdroksüsteroidide kui ka Δ^4 -ketosteroidide raja ensüümid (7, 11, 13, 15).

- see võimaldab otse hinnata kemikaali võimalikku mõju raku eluvõimele või tsütotoksilisust. See on oluline, kuna see võimaldab eristada tsütotoksilisusest tingitud mõju sellisest mõjust, mis tuleneb kemikaalide otsesest toimest steroidogeensetele radadele; selline eristamine ei ole võimalik koeeksplantatide korral, milles on palju eri tundlikkuse ja eri funktsioonidega rakutüüpe;

- meetod ei nõua loomade kasutamist;
- rakuliin H295R on kaubanduslikult kättesaadav.

10. Katsemeetodi peamised piirangud on järgmised:

- rakkude metaboliseerimisvõime ei ole teada, kuid on tõenäoliselt üsna piiratud; seepärast jäävad selle katsega tõenäoliselt avastamata kemikaalid, mida on vaja metabolismi kaudu aktiveerida;
- kuna H295R-rakud on saadud neerupealiste koest, on neis olemas ensüümid, mis võivad sünteesida glüko- ja mineraalkortikoide, samuti suguhormoone; seetõttu võib mõju glüko- ja mineraalkortikoidide sünteesile mõjutada katses täheldatavat T ja E2 taset;
- katsega ei saa määrata DHTd ja sellepärast ei saa määrata kemikaale, mis pidurdavad 5 α -reduktaasi; sellisel juhul võib kasutada Hershbergeri katset (16);
- H295R-katsega ei saa avastada kemikaale, mis segavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS-) telje kaudu; seda omadust saab uurida ainult elusloomadel tehtavate katsetega.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad T ja E2 sünteesi. T on E2 sünteesi rajal ühtlasi üks vaheühendeid. Katsega saab kindlaks teha kemikaale, mis tavaliselt pidurdavad steroidogeneesi raja ensüüme.
12. Katse tehakse tavaliselt standardse rakukultuuri tingimustes 24 süvendiga plaatidel. Katse tegemiseks võib kasutada ka muu suurusega plaate; sellisel juhul tuleb külvamist ja katsetingimusi siiski vastavalt kohandada, et järgida tulemuslikkuse kriteeriume.
13. Pärast 24-tunnist kohanemisperioodi süvenditega plaatidel viiakse rakud 48 tunniks kokkupuutesse uuritava kemikaali seitsme kontsentratsiooniga (vähemalt kolm paralleelkatset). Paralleelselt tehakse katsed lahusti ja teada oleva pidurdaja või aktiveerija ühe kindla kontsentratsiooniga; need on negatiivne ja positiivne kontroll. Kokkupuuteperioodi lõpus eemaldatakse igast süvendist katsekeskkond. Rakkude elujõulisust igas süendis kontrollitakse kohe pärast katsekeskkonna eemaldamist. Hormoonide keskmist kontsentratsiooni katsekeskkonnas saab mõõta eri meetoditega; võib kasutada müügil olevaid hormoonide mõõtmise komplekte ja/või kasutada instrumentaalseid meetodeid, näiteks vedelikkromatograafia-mass-spektromeetriat (LC-MS). Andmed väljendatakse suhtelise muutusena (kordades), võrreldes muutust lahusti kontrolli ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooniga (*lowest-observed-effect-concentration*, LOEC). Kui katse tulemus on negatiivne, teatatakse kõrgeim uuritud kontsentratsioon kui täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (*no-observed-effect-concentration*, NOEC). Järeldus kemikaali võime kohta mõjutada steroidogeneesi peaks põhinema vähemalt kahel teineteisest sõltumatul katsel. Esimese katse võib teha doosivahemiku otsimise katsena, edaspidi kohandatakse katsetes 2 ja 3 (kui need tehakse) kontsentratsioone, kui tekivad raskused lahustuvuse ja tsütotoksilisusega või kui kemikaali toime hakkab avalduma alles uuritud kontsentratsioonide vahemiku äärel.

RAKUKULTUURI KASVATAMINE

Rakuliin

14. NCI-H295R-rakke saab osta Ameerika rakukultuuride kollektsioonist (American Type Culture Collections, ATCC) materjali üleandmise lepingu (*Material Transfer Agreement*, MTA) ⁽¹⁾ allakirjutamisel.

Sissejuhatus

15. Kuna rakkude võime toota E2 muutub rakkude vanuse või passaažide arvu suurenemisega (2), tuleks rakke enne nende kasutamist kasvatada teatavate eeskirjade järgi, ning üles tuleks märkida passaažide arv pärast rakkude ülesulatamist ja passaaži number, mille juures rakud külmutati ja pandi vedelasse lämmastikku. Esimene number on tegelik rakupassaaži number ja teine number näitab rakupassaaži, milles rakud külmutati ja pandi hoiule. Näiteks rakud, mis külmutati pärast viiendat passaaži ning sulatati ja seejärel eraldati aluselt kolm korda (4 passaaži, kui loeme värskest sulatatud rakud passaažiks 1) pärast seda, kui neid oli jälle kasvatatud, saavad märgise 4.5. Nummerdamisskeemi kohta on esitatud näide valideerimisaruande I liites (4).
16. Säilituskeskkonda kasutatakse täiendatud keskkonna ja külmutamiskeskkonna alusena. Täiendatud keskkond on rakkude kasvatamise vajalik komponent. Külmutamiskeskkond on spetsiaalselt välja töötatud selleks, et rakke

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

saaks kahjustamatult külmutada pikaajaliseks säilitamiseks. Enne kasutamist tuleks Nu-seerumit (vm sarnaste omadustega seerumit, mille kohta on näidatud, et see vastab katse tegemise ja kvaliteedikontrolli nõuetele), mis on lisatud keskkonna osa, analüüsida, et teha kindlaks T ja E2 taustkontsentratsioon. Nende lahuste valmistamist on kirjeldatud valideerimisaruande II liites (4).

17. Pärast H295R-rakkude kultuuri alustamist ATCC-originaalpartiist tuleb rakke kasvatada viie passaaži jooksul (st rakke eraldatakse aluselt 4 korda). Viienda passaaži rakud külmutatakse seejärel säilitamiseks vedelas lämmastikus. Enne rakkude külmutamist kasvatatakse eelmise, neljanda passaaži rakke kvaliteedikontrolli plaadil (vt punktid 36 ja 37), millega kontrollitakse, et hormoonide baasproduktioon ja reageering positiivse kontrolli kemikaalidele vastaksid katse kvaliteedikontrolli kriteeriumidele, mis on esitatud tabelis 5.
18. H295R-rakke tuleb kasvatada, külmutada ja hoida vedelas lämmastikus selle tagamiseks, et alati on kättesaadavad vajaliku passaaži/vajalikus vanuses rakud kasvatamiseks ja kasutamiseks. H295R-katse puhul lubatav passaažide maksimaalne arv pärast uue ⁽¹⁾ või külmutatud ⁽²⁾ rakupartii kultuuri võtmist ei tohiks olla üle 10. Näiteks sobivad rakukultuuride passaažid, mis on võetud 5. passaažis külmutatud partiist, on 4.5 kuni 10.5. Külmutatud partiist alustatud rakukultuuri puhul tuleb järgida punktis 19 kirjeldatud korda. Neid rakke tuleks kasvatada vähemalt neljas (4) täiendavas passaažis (passaaž 4.5), enne kui neid kasutatakse katses.

Rakkude võtmine külmutatud varukultuurist

19. Rakkude külmutatud varukultuurist võtmise korda tuleb kasutada siis, kui uus partii rakke võetakse välja vedela lämmastikuga hoidlast kasvatamiseks ja katses kasutamiseks. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuu-ringu III liites (4). Rakud eemaldatakse vedela lämmastikuga hoidlast, sulatatakse kiiresti, pannakse tsentrifuugitopsis olevasse täiendatud keskkonda, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas ja viiakse üle kultuurikolbi. Keskkonda tuleks järgmisel päeval vahetada. H295R-rakke kasvatatakse inkubaatoris 37 °C juures õhuhumiditeeritud, mis sisaldab 5 % CO₂, ja keskkonda uuendatakse 2–3 korda nädalas. Kui rakukultuur saavutab ligikaudu 85–90 % laatumise (konfluentsuse), tuleb kultuur eraldada aluselt. Rakkude aluselt eraldamine on vajalik nende tervise ja kasvu tagamiseks, et need oleksid biokatse tegemiseks vajalikus seisundis. Rakke loputatakse kolm korda fosfaatpuhvit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca²⁺ ega Mg²⁺) ja vabastatakse rakud kultuurikolvist, milleks lisatakse sobivat ensüümi, mis aitab rakkudel eralduda, nt trüpsiiniga fosfaatpuhvit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca²⁺ ega Mg²⁺). Kohe pärast rakkude eraldumist kultuurikolvist tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda suurem kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümiga töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakukogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Sobiv kogus rakkudega lahust pannakse uude kultuurikolbi. Rakkudega lahuse kogus tuleks reguleerida selliseks, et rakud laatuva 5–7 päevaga. Soovitav alamkultuuri suhtarv on 1: 3 kuni 1: 4. Tass tuleks hoolikalt märgistada. Rakud on nüüd valmis katses kasutamiseks ja liigsed rakud tuleks külmutada vedelas lämmastikus, nagu on kirjeldatud punktis 20.

H295R-rakkude külmutamine (rakkude ettevalmistamine vedelas lämmastikus säilitamiseks)

20. H295R-rakkude ettevalmistamisel külmutamiseks tuleks korrata eespool kirjeldatud rakkude eraldamisel kasutatud korda kuni tsentrifuugitopsi põhja kogutud rakkude uuesti suspendeerimiseni. Seekord suspendeeritakse tsentrifuugitud rakkudekogum külmutamiskeskkonnas. Rakkudega lahuse viiakse üle krüoviaali, märgistatakse, nagu vaja, ja külmutatakse 24 tundi – 80 °C juures, mille järel viala pannakse hoiule vedelasse lämmastikku. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuu-ringu III liites (4).

Rakkude kandmine plaadile ja eelinkubeerimine katse tegemiseks

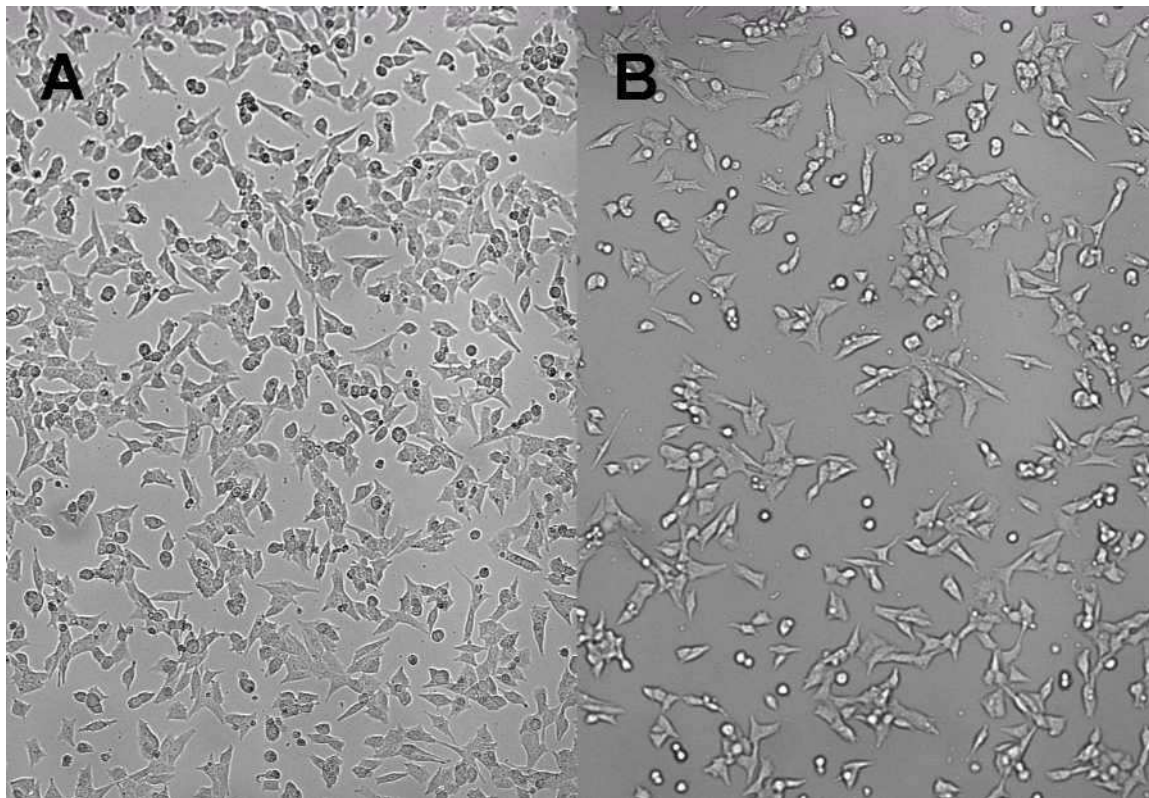
21. Katse tegemiseks vajalike punktis 19 esitatud juhendite kohaselt ettevalmistatud 24 süvendiga plaatide arv sõltub uuritavate kemikaalide arvust ja rakkude laatumisest kultuuritassidel. Üldreeglina saab ühest kultuurikolvist (75 cm²), milles laatumismäär on 80–90 %, piisava hulga rakke 1,5 (24 süvendiga) plaadi jaoks, kui vajalik rakkude tihedus on 200 000 kuni 300 000 rakku keskkonna ml-s, mis tekitab umbes 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga (joonis 2). See on tavaliselt sobivaim rakkude tihedus katses hormoonide sünteesiks. Suurema tiheduse juures muutub T ja ka E2 sünteesi ajaline käik. Enne katse esmakordset tegemist soovitatakse katsetada mitut külvamistihedust vahemikus 200 000 kuni 300 000 rakku ml-s ja edasisteks katseteks tuleks valida selline tihedus, mis annab 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga.

⁽¹⁾ „Uus partii” — uus rakkude partii, mis on saadud ATCC-lt.

⁽²⁾ „Külmutatud partii” — rakke on varem kasvatatud ja siis külmutatud mujal kui ATCC-s.

Joonis 2

H295R-rakkude mikrofoto külvamistihedusel 50 % 24 süvendiga plaadil pärast 24 tundi: A — süvendi äärel; B — süvendi keskel



22. Keskkond eemaldatakse kultuurikolvist pipetiga ja rakke loputatakse 3 korda steriilse fosfaatpuhvrit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca^{2+} ega Mg^{2+}). Lisatakse ensüümi lahust samas fosfaatpuhvrit sisaldavas soolalahuses, et eraldada rakud kultuurikolvist. Rakkude eraldumiseks sobiva aja järel tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda suurem kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümiga töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakukogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Arvutatakse rakkude tihedus, kasutades näiteks hematotsütoomeetrit või rakuloendajat. Rakkudega lahust tuleks lahjendada kuni vajaliku külvamistiheduseni ja segada hoolikalt, et tagada rakkude ühtlane tihedus. Rakud tuleks kanda plaadile, 1 ml rakkudega lahust igasse süvendisse, ning plaadid ja süvendid märgistatakse. Rakkudega plaate inkubeeritakse 24 tundi 37 °C juures õhuatmosfääris, mis sisaldab 5 % CO_2 , et lasta rakkudel kinnituda süvenditele.

KVALITEEDIKONTROLI NÕUDED

23. On väga oluline, et süvenditesse pandaks täpne maht lahuseid ja dooside lisamisel proove, kuna need mahud määravad kontsentratsioonid, mida kasutatakse katsetulemuste arvutamisel.
24. Enne rakukultuuri loomist ja edasist katsete tegemist peaks iga labor näitama, et tema hormoonide määramise süsteem on piisavalt tundlik (punktid 29–31).
25. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikehapõhiseid katseid, tuleks enne katse alustamist kontrollida, kas uuritavad kemikaalid võivad segada T ja E2 mõtmist vastavalt punktis 32 kirjeldatule.

26. Katse puhul soovitatakse lahustina kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO). Kui kasutatakse muud lahustit, tuleks määrata:
- uuritava kemikaali, forskoliini ja prokloraasi lahustuvus selles lahustis ning
 - tsütotoksilise funktsioonina lahusti kontsentratsioonist.
- Soovitatakse, et lahusti suurim lubatav kontsentratsioon ei oleks kõrgem kui solvendi madalaima tsütotoksilise kontsentratsiooni 10-kordne lahjendus.
27. Enne katse esmakordset tegemist peaks labor läbi tegema kvalifikatsioonikatse, mis näitab, et labor suudab hooldada rakukultuuri ning saavutada rakukultuuri ja eksperimentidingimused, mis on vajalikud kemikaali katsetamiseks, nagu on kirjeldatud punktides 33–35.
28. Katsete alustamisel uue partiiga tuleks enne uue partii rakkude kasutamist teha katse kontrollplaadiga, et hinnata rakkude toimimist, nagu on kirjeldatud punktides 36 ja 37.

Hormoonide määramise süsteemi toimimine

Meetodi tundlikkus, mõõtetäpsus ja kordustäpsus ning ristreaktsioonid proovi maatriksiga

29. Iga labor võib ise valida hormoonide mõõtmise süsteemi, mida ta kasutab H295R poolt sünteesitud T ja E2 määramiseks, tingimusel, et see vastab tulemuslikkuse kriteeriumidele, sealjuures mõõtmispiirile (*Limit of Quantification*, LOQ). Nominaalselt on need 100 pg/ml T puhul ja 10 pg/ml E2 puhul; väärtused põhinevad valideerimisuuringus leitud normaalsel hormoonitaseme baasväärtustel. Kuid ka kõrgem või madalam tase võib olla sobiv; see oleneb hormoonide baastasemest, mis on määratud katset tegevas laboris. Enne kvaliteedikontrolli plaadi ja uuritava kemikaali katsete käivitamist peaks labor tõendama, et kasutatava hormoonide määramise katsega saab hormoonide kontsentratsiooni mõõta täiendatud keskkonnas piisava mõõtmis- ja kordustäpsusega, et täita tabelites 1 ja 5 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid; selleks analüüsitakse täiendatud keskkonda, mida on tembitud hormooni sisestandardiga. Täiendatud keskkonda peaks olema tembitud kummagi hormooniga vähemalt kolmel kontsentratsioonil (nt 100, 500 ja 2 500 pg/ml T-d; 10, 50 ja 250 pg/ml E2; T ja E2-ga tempimise kõige madalama määrana võib kasutada ka kõige madalamaid võimalikke kontsentratsioone, arvestades valitud hormoonide määramise süsteemi avastamispiiri) ja need tuleks määrata. Ekstraheerimata proovides mõõdetud hormoonide kontsentratsioonid tohivad nominaalsest kontsentratsioonist erineda kuni 30 % ja sama proovi paralleelmõõtmiste erinevus ei tohiks olla üle 25 % (vt ka tabel 8, täiendavad kvaliteedikontrolli kriteeriumid). Kui need kvaliteedikontrolli kriteeriumid on täidetud, siis eeldatakse, et valitud hormoonide määramise süsteem on piisavalt täpne, korratav ja ei esine ristreaktsioone keskkonnaga (proovi maatriks), mis võiksid oluliselt mõjutada katse tulemust. Sellisel juhul ei ole enne hormoonide mõõtmist vaja proove ekstraheerida.
30. Kui tabelites 1 ja 8 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei ole täidetud, võib olla tegemist olulise maatriksiefektiga; sel juhul tuleb teha katse tembitud keskkonnaga ja ekstraheerida hormoonid. Ekstraheerimise käigu kohta on esitatud näide valideerimisaruande II liites (4). Hormoonide kontsentratsiooni mõõtmisel ekstraheeritud proovidest tuleks teha kolm paralleelkatset⁽¹⁾. Kui on võimalik näidata, et pärast ekstraheerimist keskkonna komponendid ei sega hormoonide määramise meetodit, nagu on määratletud kvaliteedikontrolli kriteeriumidega, tuleks kõik edaspidised katsed teha ekstraheeritud proovidega. Kui pärast ekstraheerimist ei õnnestu kvaliteedikontrolli kriteeriume täita, siis ei ole kasutatav hormoonide määramise süsteem sobiv H295R steroidogeneesi katses kasutamiseks ja tuleb kasutada muud hormoonide määramise meetodit.

Standardköver

31. Lahusti kontrolli katsetest määravad hormoonide kontsentratsioonid peaksid olema standardkövera lineaarse osa peal. Eelistatavalt peaksid lahusti kontrolli tulemused asuma lineaarse osa keskel, mis tõendaks, et on võimalik mõõta nii hormoonisünteesi pärssimist kui ka aktiveerimist. Vastavalt sellele tuleks valida keskkonna (või ekstraktide) lahjendused, mis tehakse enne mõõtmist. Lineaarne sõltuvus määratakse kindlaks sobiva statistilise meetodiga.

Kemikaali häiriva mõju katse

32. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikeha-põhiseid meetodeid nagu ensüümmuunsorptsioonanalüüs (ELISA) ja radioimmuunanalüüs (RIA), tuleks enne kemikaalidega tegelike katsete tegemist kontrollida kemikaalide võimalikku segavat mõju (valideerimisaruande III liide (4)), kuna mõni kemikaal võib neid katseid segada (17). Kui esineb segamine, mis on ≥ 20 % hormoonide T ja/või E2 baastasemest, mis määratakse hormoonanalüüsiga, tuleb kõigi uuritavate kemikaalide varulahuse lahjendustega teha hormoonide analüüsile kemikaali poolt avaldatava segava mõju katse (nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites, jaotis 5.0), et teha kindlaks lävidoos, mille

⁽¹⁾ Märkus : kui on vajalik ekstraheerimine, tehakse iga ekstraktiga kolm paralleelset määramist. Iga proovi ekstraheeritakse ainult üks kord.

juures esineb oluline ($\geq 20\%$) segamine. Kui segamine on alla 30% , võib segamise arvestamiseks viia tulemusse sisse parandi. Kui segamine on üle 30% , on andmed kõlbmatud ja selliste kontsentratsioonide juures saadud andmed tuleks jätta arvestamata. Kui uuritav kemikaal segab oluliselt hormoonide määramist rohkem kui ühel kontsentratsioonil, mis ei ole tsütotoksiline, tuleb kasutada muud hormoonide määramise süsteemi. Selleks et vältida saastavate kemikaalide segavat mõju, on soovitatav hormoonid keskkonnast sobiva lahustiga ekstraheerida; võimalikud meetodid on esitatud valideerimisaruandes (4).

Tabel 1

Tulemuste õigsuse kriteeriumid hormoonide mõõtmise süsteemide puhul

Näitaja	Kriteerium
Mõõtmismeetodi tundlikkus	Mõõtmispiir T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Hormoonide ekstraheerimise tõhusus (ainult siis, kui on vaja ekstraheerida)	Tembitud hormooniproovide keskmine ekstraheerimismäär (mis põhineb kolmel mõõtmisel) ei tohiks erineda üle 30% lisatud kogusest.
Kemikaali segav mõju (ainult antikeha-põhised süsteemid)	Olulisi ristreaktsioone ($> 30\%$ vastava hormooni baastasemest) ei ole ühegi raku poolt sünteesitava hormooniga ^(b) ^(c) .

^(a) Märkus: meetodi mõõtmispiirid põhinevad tabelis 5 esitatud hormoonide sünteesi baastaseme väärtustel ja sõltuvad määramise kvaliteedist. Kui saavutatakse kõrgem hormoonide baastase, võib piir olla kõrgem.

^(b) Mõned T ja E2 antikehad võivad suurema protsendimäära korral ristreageerida vastavalt androsteendiooni ja östrooniga. Sellisel juhul ei ole võimalik õigesti määrata mõju 17β -hüdroksüsteroidehüdrogenaasile. Siiski võib andmetest saada kasulikku teavet mõju kohta üldisele östrogenide või androgeenide sünteesile. Sellistel juhtudel tuleks andmed väljendada pigem androgeeni/östrogeeni toimena, mitte E2 ja T-na.

^(c) Need hõlmavad järgmisi: kolesterool, pregnenoloon, progesteron, 11-desoksükortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17α -pregnenoloon, 17α -progesteron, desoksükortisool, kortisool, DHEA, androsteendioon, östroon.

Labori pädevuse katse

33. Enne tundmatu kemikaali katsetamist peaks labor näitama, et ta suudab saavutada ja säilitada asjakohast rakukultuuri ja katsetingimusi, mis on vajalikud katse edukaks läbiviimiseks; selleks tehakse labori pädevuse katse. Kuna katse tulemuslikkus sõltub otseselt laboris analüüsi tegevatest inimestest, tuleb neid katseid osaliselt korrata, kui labori töötajaskonnas on muutusi.
34. Labori pädevuse katse tehakse samades tingimustes, mis on loetletud punktides 38–40: rakud viiakse kokkupuutesse tugeva, mõõduka ja nõrga aktivaatori ja pärssija 7 kontsentratsiooniga ja negatiivse kemikaaliga (vt tabel 2). Konkreetselt kuuluvad uuritavate ainete hulka järgmised kemikaalid: tugev aktivaator forskoliin (CASi nr 66575-29-9); tugev pärssija prokloraas (CASi nr 67747-09-5); mõõdukas aktivaator atrasiin (CASi nr 1912-24-9); mõõdukas pärssija aminoglutetimiid (CASi nr 125-84-8); nõrk (E2 sünteesi) aktivaator ja nõrk (T sünteesi) pärssija bisfenool A (CASi nr 80-05-7) ning negatiivne kemikaal inimese kooriongonadotropiin (HCG) (CASi nr 9002-61-3), vt tabel 2. Eraldi plaatidel tehakse katsed kõigi kemikaalidega, kasutades tabelis 6 näidatud formaati. Iga päev tuleb koos katsetega teha ka üks katse kvaliteedikontrolli plaadiga (tabel 4, punktid 36-37), millele pannakse labori pädevuse kontrollimise kemikaalid.

Tabel 2

Pädevuse kontrollimise kemikaalid ja kokkupuutekontsentratsioonid

Pädevuse kontrollimise kemikaal	Uuritavad kontsentratsioonid [μM]
prokloraas	0 ^(a) , 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1, 3, 10
forskoliin	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3, 10, 30

Pädevuse kontrollimise kemikaal	Uuritavad kontsentratsioonid [µM]
atrasiiin	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
aminoglutetimiid	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
bisfenool A	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100

^(a) Lahusti (DMSO) kontroll (0), 1 µl DMSO-d süvendisse.

H295R kokkupuude pädevuse kontrollimise kemikaalidega tuleks teha 24 süvendiga plaatidel labori pädevuse kontrollimise katse ajal. Doosi ühik kõigi uuritavate kemikaalide puhul on µM. Doosid tuleks manustada DMSO-lahusena, 0,1 mahuprotsenti igasse süvendisse. Iga uuritavat kontsentratsiooni tuleks katsetada kolmes süendis (tabel 6). Iga kemikaali uuritakse eraldi plaadil. Iga päev lisatakse plaatide hulka üks kvaliteedikontrolli plaat.

35. Rakkude elujõulisuse ja hormoonide analüüsid tuleb teha vastavalt punktidele 42–46. Teatatakse läviväärtus (vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, *lowest observed effect concentration*, LOEC) ja otsus klassifitseerimise kohta ning tulemusi võrreldakse tabelis 3 esitatud väärtustega. Andmed loetakse kasutamiskõlblikuks, kui need vastavad LOEC-le ja klassifitseerimisotsusele, mis on esitatud tabelis 3.

Tabel 3

Läviväärtused (LOEC) ja klassifitseerimisotsused pädevuse kontrollimise kemikaalide puhul

	CASi number	LOEC [µM]		Klassifitseerimisotsus	
		T	E2	T	E2
prokloraas	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ ^(a) (Pärssimine)	+ (pärssimine)
forskoliin	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
atrasiiin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
aminoglutetimiid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (pärssimine)	+ (pärssimine)
bisfenool A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (pärssimine)	+ (aktiveerimine)
HCG	9002-61-3	Puudub	Puudub	Negatiivne	Negatiivne

^(a) +, positiivne

Puudub: ei kohaldata, kuna pärast kokkupuudet negatiivse kontrolli mittetsütotoksilise kontsentratsiooniga ei tohiks muutusi olla.

Kvaliteedikontrolli plaat

36. Kvaliteedikontrolli plaati kasutatakse H295R-rakkude toimimise tõendamiseks rakkude kasvatamise standardtingimustes ja varasemate katsete andmebaasi loomiseks, millesse pannakse hormoonide kontsentratsioon lahusti kontrolli katsetes, positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes, samuti varasemate katsete muud kvaliteedikontrolli peegeldavad näitajad.
- H295R-rakkude toimimist tuleks hinnata nii, et kvaliteedikontrolli plaadiga kontrollitakse iga uut ATCC partiidi, samuti varem külmutatud rakkude iga sulatatud partiidi, kui sama rakkude partiiga ei tehta labori pädevuse katset (punktid 32–34).
 - Üks kvaliteedikontrolli plaat võimaldab täielikult hinnata katse tingimusi (nt rakkude elujõulisus, lahusti kontrollid, negatiivsed ja positiivsed kontrollid, samuti katsetevaheline ja katsesisene varieeruvus) kemikaali katsetamisel ning see peaks kuuluma iga katse juurde.
37. Kvaliteedikontrolli katse tehakse 24 süvendiga plaadil ja selle puhul kasutatakse samasugust inkubeerimise, dooside manustamise, rakkude eluvõimelisuse või tsütotoksilisuse määramise, hormoonide ekstraheerimise ja analüüsimise korda, mida on kirjeldatud punktides 38–46 kemikaalide katsetamiseks. Kvaliteedikontrolli plaadil

on tühikatsed, lahusti kontrollid ning E2 ja T teadaoleva aktivaatori kaks kontsentratsiooni (forskoliin, 1 ja 10 µM) ning teadaoleva pärssija kaks kontsentratsiooni (prokloraas, 0,1 ja 1 µM). Lisaks kasutatakse MeOH teatavates süvendites kui rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse positiivset kontrolli. Plaadi üksikasjalik kirjeldus on esitatud tabelis 4. Kriteeriumid, millele peavad vastama kvaliteedikontrolli plaadi tulemused, on loetletud tabelis 5. Nii lahusti kontrolli kui ka tühikatsete süvendites tuleb saavutada T ja E2 sünteesi minimaalne baastase.

Tabel 4

Kvaliteedikontrolli plaat, millega kontrollitakse mõjutamata H295R-rakkude ja teadaolevate pärssijatega (PRO — prokloraas) ja aktiveerijate (FOR — forskoliin) kokkupuutes olevate H295R-rakkude E2 ja T sünteesi. Pärast kokkupuutekatse lõpetamist ja keskkonna kõrvaldamist lisatakse kõikidesse MeOH süvenditesse 70 % metanoolilahust; see on tsütotoksilisuse positiivne kontroll (vt tsütotoksilisuse katse valideerimisaruande (4) III liites)

	1	2	3	4	5	6
A	Tühikatse ^(a)	Tühikatse ^(a)	Tühikatse ^(a)	Tühikatse ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Tühikatse ^(a) (+ MeOH) ^(b)	Tühikatse ^(a) (+ MeOH) ^(b)
B	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)	DMSO ^(c) 1 µl (+ MeOH) ^(b)
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

^(a) Tühikatse süvendites olevatele rakkudele lisatakse ainult keskkonda (st lahustit ei lisata).

^(b) Metanool (MeOH) lisatakse pärast seda, kui kokkupuude on lõpetatud ja keskkond on nendest süvenditest eemaldatud.

^(c) DMSO lahusti kontrolli katse (1 µl süvendi kohta).

Tabel 5

Kvaliteedikontrolli plaadi tulemuslikkuse kriteeriumid

	T	E2
Hormoonide baassüntees lahusti kontrollis (SC)	≥ 5 korda LOQ	≥ 2,5 korda LOQ
Aktiveerimine (10 µM forskoliin)	≥ 1,5 korda SC	≥ 7,5 korda SC
Pärssimine (1µM prokloraas)	≥ 0,5 korda SC	≥ 0,5 korda SC

KEMIKAALIGA KOKKUPUUTESSE VIIMINE

38. Eelinkubeeritud rakud võetakse inkubaatorist välja (punkt 21) ja kontrollitakse mikroskoobi all, et teha kindlaks, kas need on heas seisundis (kleepumine, morfoloogia) enne kemikaaliga kokkupuutesse viimist.
39. Rakud pannakse bioohutuskambrisse ja eemaldatakse täiendatud keskkond ning asendatakse uue täiendatud keskkonnaga (1 ml süvendi kohta). Käesoleva katsemeetodi puhul on eelistatud lahusti DMSO. Kui on olemas põhjusi muude lahustite kasutamiseks, tuleks esitada teaduslik põhjendus. Rakud viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse, milleks lisatakse 1 µl sobivat põhilahust dimetüülsulfoksiidis (vt valideerimisaruande (4) II liide) süvendis oleva täiendatud keskkonna 1 ml kohta (süvendi maht). Sellega saavutatakse süvendites DMSO lõppkontsentratsioon 0,1 %. Vajaliku segamise kindlustamiseks eelistatakse üldiselt segada uuritava kemikaali sobiv põhilahus

DMSOs täiendatud keskkonnaga, et saada iga doosi vajalik lõppkontsentratsioon, ja selline segu lisatakse igasse süvendisse kohe pärast vana keskkonna eemaldamist. Kui kasutatakse sellist varianti, peaks DMSO kontsentratsioon (0,1 %) olema ühesugune kõikides süvendites. Süvendeid, milles on kaks kõige kõrgemat kontsentratsiooni, kontrollitakse visuaalselt stereomikroskoobiga, et neis ei oleks sadet ega hägu, mis osutaks kemikaali ebapiisavale lahustuvusele. Kui leitakse hägusust või sademe tekkimist, kontrollitakse ka järgmise kahe kontsentratsiooniga süvendeid (jne); kontsentratsioonid, mille juures ei saavutatud täielikku lahustumist, ei arvestata edasisel hindamisel ja analüüsil. Plaat pannakse tagasi inkubaatorisse 37 °C juurde 5 % CO₂-sisaldusega õhu atmosfääri 48 tunniks. Uuritava kemikaaliga katse plaat on näidatud tabelis 6. Põhilahused 1–7 näitavad uuritava kemikaali suurenevate dooside paigutust.

Tabel 6

Dooside manustamise skeem H295R-rakkude kokkupuutel uuritava kemikaaliga 24-süvendilisel plaadil

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

40. Pärast 48-tunnist kokkupuudet võetakse plaadid inkubaatorist ja iga süvendit kontrollitakse mikroskoobiga rakkude seisundi (kleepumine, morfoloogia, laatumise määr) ja tsütotoksikoloogilise suhte. Iga süvendi kesk-kond jagatakse kaheks võrdseks osaks (kumbki ligikaudu 490 µl) ja kantakse kahte korralikult märgistatud viaali (st üks alikvoot annab iga süvendi kohta varuproovi). Rakkude kuivamise vältimiseks eemaldatakse keskkond korraga ühe rea süvenditest ja asendatakse keskkonnaga rakkude eluvõimelisuse (tsütotoksilisuse) katseks. Kui rakkude eluvõimelisust (tsütotoksilisust) kohe määrama ei hakata, lisatakse igasse süvendisse 200 µl fosfaatpuhvrit sisaldavat soolalahust, mis sisaldab Ca²⁺ ja Mg²⁺. Keskkond külmutatakse – 80 °C juures kuni edasise töötlemiseni hormoonikontsentratsioonide määramiseks (vt punktid 44–46). T ja E2 on – 80 °C juures hoitavas keskkonnas üldiselt stabiilsed vähemalt kolm kuud, kuid hormoonide stabiilsus säilitamisel tuleks dokumentaalselt tõendada igas laboris.
41. Kohe pärast keskkonna eemaldamist määratakse igal kemikaaliga kokkupuute plaadil rakkude eluvõimelisus/tsütotoksilisus.

Rakkude eluvõimelisuse määramine

42. Rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katset võib teha mitmel viisil; katse eesmärk on teha kindlaks kemikaali võimalik mõju rakkude eluvõimele. Katsega peaks saama määrata süvendis olevate eluvõimeliste rakkude tegelikku protsendimäära või tuleb näidata, et see on võrreldav katsega Live/Dead® (on selle lineaarne funktsioon) (vt valideerimisaruande (4) III liide). Samavõrra hästi töötab teine katse MTT-ga ([3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-dife-nüültetrasooliumbromiid] (18)). Rakkude eluvõimelisuse hindamine nimetatud meetoditega on suhteline ja selle puhul ei pruugi tingimata olla lineaarset sõltuvust süvendis olevate rakkude absoluutsest arvust. Seepärast tuleks igas süvendis rakke paralleelselt hinnata ka silmaga ning teha lahusti kontrolli ja kahe kõrgeima mittetsütotoksilise kontsentratsiooni katse digitaalpildid arhiivi jaoks, et hiljem oleks võimalik määrata tegelikku rakkude tihedust, kui seda on vaja. Kui visuaalne kontrollimine või eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katse näitab rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist kasvu kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katse-protokolli. Rakkude eluvõimelisus väljendatakse suhtena lahusti kontrolli katsete keskmisse tulemusse; viimast peetakse 100 % eluvõimelisuseks ja see arvutatakse vastavalt kasutatava rakkude eluvõimelisuse/tsütolooogilisuse katse eeskirjale. MTT-katse puhul võib kasutada järgmist valemit:

eluvõimeliste rakkude % = (väärtus süvendis – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskvaartus) ÷ (lahusti-kontrolli süvendite keskvaartus – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskvaartus)

43. Süvendid, milles eluvõimelisus on alla 80 % võrreldes keskmise eluvõimelisusega lahusti kontrolli katsetes (= 100 % eluvõimelisus), tuleks lõplikust andmete analüüsist välja jätta. Kui steroidogeneesi pärssimine toimub peaaegu 20-protsendilise tsütotoksilisuse juures, tuleb tulemust hoolikalt hinnata ja tõendada, et pärssimise põhjuseks ei ole tsütotoksilisus.

Hormoonide analüüs

44. Iga labor võib kasutada vabalt valitud süsteemi hormoonide T ja E2 mõõtmiseks. Iga doosirühma vabasid keskkonna alikvoote võib kasutada lahjenduste tegemiseks, et viia kontsentratsioon standardkõvera lineaarsesse osasse. Nagu märgitud punktis 29, peaks iga labor tõendama, et tema hormoonide määramise süsteem (nt ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) vastab kvaliteedikontrolli kriteeriumidele. Selle jaoks tuleb enne kvaliteedikontrolli katseid või kemikaalide katsetamist täiendatud keskkonda tempida hormooni sisestandardiga. Selleks et tagada, et katsesüsteemi komponendid ei segaks hormoonide määramist, võib olla vajalik need enne määramist keskkonnast ekstraheerida (vt punkt 30, millistel tingimustel ekstraheerimine on või ei ole vajalik). On soovitatav teha ekstraheerimine nii, nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites.
45. Kui hormoonide sünteesi mõõdetakse kaubandusliku katsekomplektiga, tuleb hormoonide analüüs teha vastavalt katsekomplekti tootja juhenditele. Enamikul tootjatest on oma individuaalne meetod hormoonide analüüsi tegemiseks. Uuritavaid proove on vaja lahjendada nii, et eeldatavad hormoonide kontsentratsioonid lahusti kontrolli katsetes langevad üksikkatse standardkõveral lineaarse osa keskele (valideerimisaruande (4) III liide). Väärtused väljaspool standardkõvera lineaarset osa tuleb jätta arvestamata.
46. Lõplik hormoonide kontsentratsioon arvutatakse järgmiselt.

Näide:

Ekstraheeriti:	450 µl keskkonda
Lahustati:	250 µl katsepuhvrts
Lahjendus analüüsiks:	1: 10 (proovi tulemuse toomiseks standardkõvera lineaarsesse osasse)
Hormooni kontsentratsioon mõõdetud proovis:	150 pg/ml (pärast kohandamist kontsentratsiooniks mõõdetud proovi milliliitris)
Taas leitud:	89 %
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	(hormooni kontsentratsioon (milliliitri kohta) ÷ taas leitud) (lahjendus-tegur)
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	$(150 \text{ pg/ml}) \div (0,89) \times (250 \text{ µl}/450 \text{ µl}) \times 10 = 936,3 \text{ pg/ml}$

Uuritavate kontsentratsioonide valimine

47. Tuleks teha vähemalt kaks sõltumatut analüüsikatset. Kui katses kasutatavate kontsentratsioonide valimiseks ei ole varasemast teavet lahustuvuspiiride või tsütotoksilisuse kohta, siis soovitakse esimesel katsel võtta katsekontsentratsioonid vahel $\log_{10}$, kusjuures 10^{-3} M on maksimaalne kontsentratsioon. Kui kemikaal on lahustuv ja ei ole

tsütotoksiline ühelgi uuritud kontsentratsioonil ning esimesel katsel andsid kõik kontsentratsioonid negatiivse tulemuse, siis tuleb seda kinnitada veel ühe katsega, kasutades samu tingimusi kui esimesel katsel (tabel 7). Kui esimese katse tulemused on *ebaselged* (st suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga võrreldes statistiliselt oluline ainult ühel kontsentratsioonil) või positiivsed (st suuruse suhteline muutus lahusti kontrolliga võrreldes on statistiliselt oluline kahe või enama kõrvuti oleva kontsentratsiooni puhul), tuleb katset korrata, nagu on näidatud tabelis 7, täpsustades katseks kontsentratsioonide valimist. Uuritavaid kontsentratsioone teises ja kolmandas katses (kui see tehakse) tuleks kohandada, arvestades esimeses katses mõju põhjustanud kontsentratsioonivahemikku, kasutades poole logaritmilise ühiku suurusi kontsentratsioonivahemikke (nt kui esimeses katses kontsentratsioonidega 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 µM leiti aktivatsioon kontsentratsioonidel 1 ja 10 µM, tuleks teises katses valida kontsentratsioonideks 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 µM), kui ei ole vaja kasutada väiksemaid kontsentratsioone LOEC saavutamiseks. Viimasel juhul kasutatakse vähemalt viit kontsentratsiooni allpool madalaimat esimeses katses uuritud kontsentratsiooni poole logaritmilise ühiku suuruse vahega. Kui teine katse ei kinnita esimest katset (st statistiliselt olulist erinevust ei leita varem positiivse kontsentratsiooni ümbruses ± 1 kontsentratsiooniinkrement), tuleb teha kolmas katse, kasutades esialgseid katsetingimusi. Esimese katse *ebaselged* tulemused loetakse negatiivseks, kui täheldatud mõju ei õnnestu kinnitada ühegi järgmisest kahest katsest. *Ebaselged* tulemused loetakse positiivseks toimeks, kui reaktsiooni õnnestub kinnitada vähemalt ühes järgmises katses kontsentratsioonil ± 1 kontsentratsiooniinkrement (vt punkt 55, andmete tõlgendamise meetod).

Tabel 7

Otsuste maatriks võimalike tulemusestsenaariumide korral

1. katse	2. katse		3. katse		Otsus	
Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Positiivne	Negatiivne
Negatiivne	Kinnita ^(a)	Negatiivne	Stopp			X
Negatiivne	Kinnita ^(a)	Positiivne	Täpsusta ^(b)	Negatiivne		X
Ebaselge ^(c)	Täpsusta ^(b)	Negatiivne	Kinnita ^(a)	Negatiivne		X
Ebaselge ^(c)	Täpsusta ^(b)	Negatiivne	Kinnita ^(a)	Positiivne	X	
Ebaselge ^(c)	Täpsusta ^(b)	Positiivne			X	
Positiivne	Täpsusta ^(b)	Negatiivne	Kinnita ^(a)	Positiivne	X	
Negatiivne	Kinnita ^(a)	Positiivne	Täpsusta ^(b)	Positiivne	X	
Positiivne	Täpsusta ^(b)	Positiivne	Stopp		X	

^(a) Kinnita eelmist katset, kasutades sama eksperimendiplaani.

^(b) Korda katset poole logaritmilise ühiku suuruste kontsentratsioonivahemikega (mõlemale poole kontsentratsioonist, mis eelmises katses osutus oluliselt erinevaks).

^(c) Suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga võrreldes statistiliselt oluline ühel kontsentratsioonil.

Katseplaadi kvaliteedikontroll

48. Lisaks kvaliteedikontrolli plaadi kriteeriumide täitmisele tuleks täita ka muid kvaliteedikriteeriume, mis on seotud paralleelsüvendite tulemuste lubatavate erinevustega, korduskatsetega, hormooni määramise süsteemide lineaarsuse ja tundlikkusega, ühest ja samast proovist hormooni paralleelsete määramiste erinevustega ja tembitud hormoonipiikide taasleidmise protsendimääraga pärast keskkonna ekstraheerimist (kui seda tehakse; vt nõuded ekstraheerimisele, punkt 30); sellised kvaliteedikriteeriumid on esitatud tabelis 8. Andmed peaksid langema iga näitaja lubatavasse väärtuste vahemikku, ainult siis saab neid arvestada edasisel hindamisel. Kui need kriteeriumid ei ole täidetud, tuleks tabelis märkida, et kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei olnud kõnealuses proovis täidetud; proov tuleks uuesti analüüsida või andmed välja visata.

Tabel 8

H295R-katse plaadi näitajate lubatavad väärtused ja varieerumisvahemik (%)

(LOQ — hormooni määramise süsteemi mõõtmispiir (*Limit of Quantification*); CV — variatsioonikordaja; SC — lahusti kontrollkatse; DPM — lagunemist minutis)

	Võrreldavad suurused	T	E2
Hormoonide baassüntees lahusti kontrolli katsetes	Suhteline suurenemine võrreldes LOQga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Kokkupuutekatsed — plaadisine CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelsüvendid)	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 30 %	≤ 30 %
Kokkupuutekatsed — plaatidevaheline CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelkatsed)	Muutus kordades	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormoonide mõõtmise süsteem — tundlikkus	Tuvastatav suhteline vähenemine, võrreldes lahusti kontrolliga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Hormoonide mõõtmise süsteem — kordusmõõtmised lahusti kontrollide CV ^(a)	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 25 %	≤ 25 %
Keskkonna ekstraheerimine — 3H-sisestandardi taastamine (vajaduse korral)	DPM	≥ 65 % nominaalsest	

(^a) Tähendab ühe ja sama proovi kordusmõõtmisi.

KATSEANDMETE ANALÜÜS JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete analüüs

49. Selleks, et hinnata hormoonide sünteesi suhtelist suurenemist või vähenemist kemikaali juuresolekul, tuleb tulemused normeerida lahusti kontrolli tulemuste keskvärtusega igal plaadil, ja tulemused esitatakse suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga igal katseplaadil. Kõik andmed esitatakse kujul keskvärtus ±1 standardhälve (SD).
50. Andmete analüüsil arvestatakse ainult süvendeid, milles tsütotoksilisus oli alla 20 %. Suhtelised muutused tuleks arvutada järgmiselt:

suhteline muutus = (hormooni kontsentratsioon igas süendis) ÷ (kõikide lahusti kontrollide hormooni kontsentratsiooni keskvärtus).

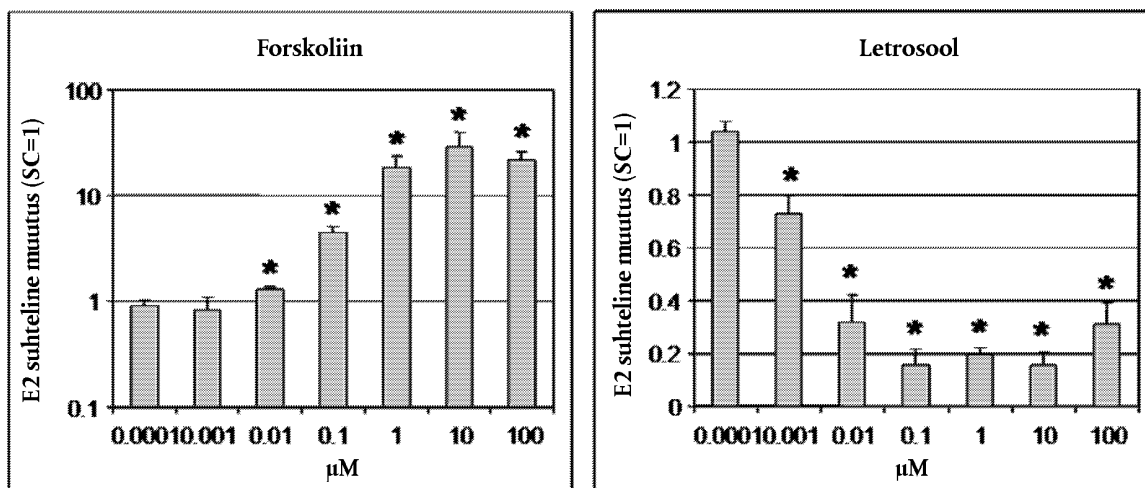
51. Kui süvendi visuaalse kontrollimise või punktis 42 kirjeldatud eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katsega näidati rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist suurenemist kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katseprotokollis.
52. Enne statistilise analüüsi tegemist tuleks hinnata normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse eelduste kehtivust. Normaaljaotust tuleks hinnata standardsete tõenäosusgraafikute või muu sobiva statistilise meetodiga (nt Shapiro-Wilki katse). Kui andmed (suhtelised muutused kordades) ei ole normaaljaotusega, tuleks püüda andmeid teisen-dada, et lähendada neid normaaljaotusele. Kui andmed on normaaljaotusega või ligikaudu normaaljaotusega, tuleks analüüsida erinevusi kemikaali kontsentratsioonirühmade ja lahusti kontrollide vahel, kasutades parameetri-list testi (nt Dunnetti test), milles *kontsentratsioon* on sõltumatu muutuja, ja *toime* (suhteline muutus kordades) on sõltuv muutuja. Kui andmed ei ole normaaljaotusega, tuleb kasutada sobivat mitteparameetrilist testi (nt Kruskal Wallis, Steeli mitmese võrdluse astaktest). Erinevused loetakse oluliseks $p \leq 0,05$ puhul. Statistiline hindamine tehakse iga süvendi keskvärtuste alusel, mis esindavad sõltumatuid paralleelidega andmepunkte. Eeldatakse, et kuna esimeses katses on dooside vahel suured vahed ($\log_{10}$ skaala), ei ole paljudel juhtudel võimalik täpselt kirjeldada kontsentratsiooni-toime sõltuvust, kui kaks kõrgeimat kontsentratsiooni on sigmoidse kõvera lineaarses osas. Seepärast kasutatakse esimese katse või muude andmete puhul, kus see olukord esineb (nt kui ei hinnata maksimaalset tõhusust), I tüüpi fikseeritud muutuja statistikat, nagu on kirjeldatud eespool.

53. Kui rohkem kui kaks andmepunkti asuvad kõvera lineaarsel osal ja on võimalik arvutada maksimaalseid tõhususi — nagu eeldatakse mõne teise katse juures, mille tegemisel kasutatakse poole logaritmilise ühiku suurusi kokkupuutekontsentratsioonide erinevusi — tuleks kasutada probit-, logit- või muud sobivat regressioonimudelit, et arvutada tõhususega seotud kontsentratsioone (nt EC50 ja EC20).
54. Tulemused tuleks esitada nii graafiliselt (tulpdiaграмmid, mis näitavad keskväärtust ± 1 SD) kui ka tabelina (LOEC/NOEC, mõju suund, ja maksimaalse toime tugevus, mis on osa andmete doosi-toime aspektist) (vt näide joonisel 3). Andmete hindamine on ainult siis kehtiv, kui see põhineb vähemalt kahel sõltumatul katsel. Katset loetakse sõltumatuks, kui see on läbi viidud muul kuupäeval, uute lahuste ja kontrollidega. Teises ja (vajaduse korral) kolmandas katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku võib valida esimese katse tulemuste põhjal, et paremini määratleda doosi-toime vahemik, milles asub LOEC (vt punkt 47).

Joonis 3

H295R-katsega saadud andmete graafikuna ja tabelina esitamise ja hindamise näide

(tärn märgib statistiliselt olulisi erinevusi solvendi kontrollist ($p < 0,05$); LOEC — vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (*lowest observed effective concentration*); suurim muutus — toime maksimaalne tugevus igal kontsentratsioonil võrreldes lahusti kontrolli keskväärtusega (= 1))



Kemikaal	LOEC	Suurim muutus
forskoliin	0,01	0,15 korda
letrosool	0,001	29 korda

Andmete tõlgendamise kord

55. Uuritav kemikaal tunnistatakse positiivseks, kui suhteline aktivatsioon (kordades) on statistiliselt erinev ($p \leq 0,05$) lahusti kontrollist kahel kõrvuti oleval kontsentratsioonil vähemalt kahes sõltumatus katses (tabel 7). Uuritav kemikaal tunnistatakse negatiivseks pärast kahte sõltumatut negatiivset katset või pärast kolme katset, millest kaks olid negatiivsed ja üks ebaselge või positiivne. Kui andmed, mis on saadud kolme iseseisva katsega, ei vasta tabelis 7 loetletud otsustamise kriteeriumidele, ei ole uurimistulemused tõlgendatavad. Tulemusi, mis on saadud lahustuvuspiirist kõrgema või tsütotoksilise kontsentratsiooni juures, ei tohiks kasutada tulemuste tõlgendamiseks.

Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uurimislabor:

- nimi ja asukoht;
- uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;
- uuringu alguse ja lõpetamise kuupäevad.

Uuritav kemikaal, reaktiivid ja kontrollid:

- identifitseerimisandmed (nimetus ja CASi number, kui on olemas), päritolu, partii number, puhtus, tarnija, ning uuritava kemikaali, reaktiivide ja kontrollide iseloomustus;
- uuritava kemikaali füüsiline olek ja asjaomased füüsikalised-keemilised omadused;
- uuritavate kemikaalide, reaktiivide ja kontrollide säilitustingimused ning katseks ettevalmistamise meetod ja sagedus;
- uuritava kemikaali stabiilsus.

Rakud:

- allikas ja rakutüüp;
- katses kasutatud rakkude passaažide arv (rakupassaaži tunnus);
- rakukultuuride säilitusmeetodite korra kirjeldus.

Enne katset täidetavad nõuded (vajaduse korral):

- uuritava kemikaali võimalik segav mõju hormoonide määramise süsteemile — kontrollkatse kirjeldus ja tulemused;
- hormoonide ekstraheerimise tõhususe mõõtmised — kirjeldus ja tulemused;
- kõigi tehtavate analüüsides standard- ja kaliibrimiskõverad;
- valitud analüüsimeetodite avastamispiir.

Katsetingimused:

- keskkonna koostis;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon;
- rakkude tihedus (hinnatud või mõõdetud rakkude kontsentratsioon 24 ja 48 tunni järel);
- uuritava kemikaali lahustuvus (lahustumispiir, kui see on määratud);
- inkubatsiooniaeg ja tingimused.

Katsetulemused:

- iga kontrollisüvendi ja kemikaaliga süvendi töötlemata andmed — iga üksiku mõõtmise tulemus otse sellisel kujul, mille annab hormoonide mõõtmiseks kasutatav vahend (nt optilise tiheduse ühikutes, fluorestsentsi ühikutes, lagunemiste arv minutis jne);
- normaaljaotuse eelduse kontrollimine või andmete teisendamise selgitus;
- keskmine toime ± 1 standardhälve igas mõõdetud süvendis;
- tsütotoksilisuse andmed (uuritavad kontsentratsioonid, mis olid tsütotoksilised);
- kinnitus selle kohta, et kvaliteedikontrolli nõuded olid täidetud;
- suhteline muutus võrreldes lahusti kontrolli proovidega, tsütotoksilisuse parandiga;
- tulpdiagramm, mis näitab suhtelist muutust (kordades) igal kontsentratsioonil, koos standardhälbe ja statistilise olulisusega, vt punktid 49–54.

Andmete tõlgendamine:

- andmete tõlgendamise korra kohaldamine tulemustele ja tähelepanekute arutelu.

Arutelu:

- kas tulemustest järeldub midagi võimaluse kohta, et T ja E2 andmeid võisid mõjutada kaudsed mõjud glüko- ja mineraalkortikoidide radadele?

Järeldused

KIRJANDUS

- 1) OECD (2002), Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik, käesoleva lisa peatüki B.54 2. liide.
- 2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114–124.
- 3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- 4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- 5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- 6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Kättesaadav aadressil http://www.epa.gov/endo/pubs/edmv/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf
- 7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78–89.
- 8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44–54.
- 9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265–272.
- 10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137–1148.
- 11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488–5496.
- 12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578–584.
- 13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777–2785.
- 14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137–1148.
- 15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., McCarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731–737.
- 16) Käesoleva lisa peatükk B.55. Hersherbergeri biokatse rottidel: kiire söelkatse (anti)androgeensete omaduste väljaselgitamiseks
- 17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222–231.
- 18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55–63.

-
- 19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
 - 20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484–492.
-

Liide

MÕISTED

CV (Coefficient of Variation) – variatsioonikordaja, määratletud kui jaotuse standardhälbe ja aritmeetilise keskmise suhtarv.

CYP – tsütokroom P450 monooksügenaasid, geenide ja nende järgi sünteesitud ensüümide perekond, mis osaleb väga paljude biokeemiliste reaktsioonide katalüüsides, sealhulgas steroidhormoonide sünteesi ja metabolismi katalüüsides.

DPM (disintegrations per minute) – lagunemiste arv minutis. See on teatava koguse radioaktiivse aine ühe minuti jooksul lagunenud aatomite arv.

E2 – 17β -östradiol, kõige tähtsam östrogeen imetajate hormoonisüsteemides.

H295R-rakud – inimese adrenokartsinoomi rakud, millel on tsonaalselt diferentseerumata inimloote neerupealise rakkude füsioloogilised omadused ning milles on ekspresseeritud kõik steroidogeneesi raja ensüümid. Selliseid rakke saab tellida ATCC-st.

Katse – sõltumatu eksperiment, mis tehakse uute lahuste ja uute kontrollidega.

Katseplaat – plaat, millel H295R-rakud viiakse kokkupuutesse uuritavate kemikaalidega. Katseplaadil on lahusti kontroll ja uuritav kemikaal seitsmes kontsentratsioonis, igaüks kolme paralleelina.

Kvaliteedikontroll (QC) – osutab meetmetele, mida on vaja võtta kasutamiskõlblike andmete saamiseks.

Kvaliteedikontrolli plaat – 24 süvendiga plaat, millel on positiivse ja negatiivse kontrolli kaks kontsentratsiooni, millega kontrollitakse uue rakkude partii toimimist või tehakse katse positiivsed kontrollid kemikaalide katsetamisel.

Kemikaal – aine või segu.

Külmutuskeskkond – keskkond, mida kasutatakse rakkude külmutamiseks ja milles hoitakse külmutatud rakke. Selle koostis on järgmine: varulahusekeskkond pluss BD NuSerum ja dimetüülsulfoksiid.

Laatumismäär – iseloomustab pinna katmise või paljunemise määra, mida rakkudele võimaldatakse kasvukeskkonna pinnal või sees.

Lineaarne osa – hormoonide määramise süsteemi standardkõvera osa, milles tulemus on võrdeline proovis oleva analüüdi kontsentratsiooniga.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) – vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, mille juures katse tulemus on statistiliselt erinev lahusti kontrolli tulemusest.

LOQ (Limit of Quantification) – mõõtmispiir, väikseim kogus kemikaali, mida saab eristada kõnealuse kemikaali puudumisest (tühikatse) teatava usalduspiiri juures. Käesoleva meetodi puhul on LOQ tavaliselt katsesüsteemi valmistaja poolt ette antud, kui seda ei ole täpsustatud teisiti.

NOEC (No Observed Effect Concentration) – kõrgeim uuritud kontsentratsioon, mille juures analüüs ei näita positiivset tulemust.

Passaaz – kordade arv, millal rakud on pärast külmutatud tüvikultuurist kultuuri loomist aluselt eraldatud. Lähtepassaazile, mis tehakse külmutatud tüvikultuurist, omistatakse number üks (1). Rakud, mis on aluselt eraldatud üks kord, nimetatakse passaaziks 2 jne.

PBS – Dulbecco fosfaatpuhvriisandiga keedusoolalahus.

Steroidogenees – sünteesirada, mille kaudu kolesteroolist sünteesitakse mitmesugused steroidhormoonid. Steroidide sünteesi raja mitu vahesaadust nagu progesteron ja testosteroon on ise olulised hormoonid; samas on nad sünteesiraja edasiste hormoonide eellased.

T – testosteroon, üks kahest kõige olulisemast androgeenist imetajate hormoonisüsteemides.

Trüpsiin 1X – lahjendatud trüpsiini (üks ensüüme, kõhunäärme seriinproteas) lahus, mida kasutatakse rakkude eraldamiseks rakkude kasvutamise plaadilt, vt valideerimisaruande (4) III liide.

Täiendatud keskkond – varukeskkond pluss BD Nu-Serum ja ITS+ premium mix, vt valideerimisaruande (4) II liide.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Varukeskkond – lähtekeskkond, mis on alus muude reagendilahuste valmistamiseks. See koosneb Dulbecco modifitseeritud Eagle'i keskkonna ja Hami F-12 toitainesegust (DMEM/F12) vahekorras 1: 1 15 mM HEPES-puhvris, mis ei sisalda fenoolpunast ega Na-vesinikkarbonaati. Na-vesinikkarbonaat lisatakse puhverdamiseks, vt valideerimisaruande (4) II liide.

B.58. TRANSGEENSE NÄRILISE SOMAATILISTE JA SUGURAKKUDE GEENIDE MUTATSIOONI KATSE**SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 488 (2013). ELil on katsemeetodid paljude *in vitro* geenmutatsioonide uuringute tegemiseks, millega on võimalik avastada kromosoomide ja/või geenide mutatsioone. On olemas katsemeetodid *in vivo* näitajate (st kromosoomihälvete ja plaanivälise DNA sünteesi) määramiseks; kuid nendega ei saa mõõta geenimutatsioone. Transgeense närilise (*transgenic rodent*, TGR) mutatsiooni katse rahuldab vajaduse praktilise ja kergesti kättesaadava *in vivo* katse järele, millega saab määrata geenimutatsioone.
2. TGR-mutatsioonikatse kohta on avaldatud põhjalikke ülevaateid (24, 33). Nendes kasutatakse transgeenseid rotte ja hiiri, kelle kromosoomidesse on integreeritud rohkesti plasmidi või faagi-ülekandektorite koopiasid (transgeene). Transgeenid sisaldavad reportergeene mitmesugust tüüpi mutatsioonide avastamiseks, mida *in vivo* tekitavad uuritavad kemikaalid.
3. Närilises tekkivaid mutatsioone loendatakse transgeeni väljavõtmise ja reportergeeni fenotüübi analüüsimisega bakteriaalses peremees-organismis, kellel vastavat reportergeeni ei ole. TGR geenimutatsiooni katsetega mõõdetakse mutatsioone, mis on tekkinud geneetiliselt neutraalsetes geenides, mis eraldatakse praktiliselt kõikidest närilise kudedest. Nende katsetega võib seepärast üle saada paljudest olemasolevatest piirangutest, mis on seotud *in vivo* geenimutatsioonide uurimisega endogeensetes geenides (näiteks piiratud hulk analüüsikõlblikke kudesid, negatiivne või positiivne selektsioon mutatsioonide vastu).
4. Olemasolevad tõendid näitavad veenvalt, et transgeenid reageerivad mutageenidele samal viisil kui endogeensed geenid, eriti mis puutub alusepaari asendustesse, raaminihkemutatsioonidesse ning väikestesse deletsioonidesse ja insertioonidesse (24).
5. Genotoksilisuse testimise rahvusvahelistel seminaridel (IWGT) on toetatud TGR-geenimutatsioonikatse kasutamist geenimutatsioonide avastamiseks *in vivo* ja on esitatud soovituslik katse-eeskiri selliste katsete tegemiseks (15, 29). Käesolev katsemeetod põhineb kõnealustel soovitudel. Käesoleva katse-eeskirja kasutamist toetav täiendav analüüs on esitatud viites (16).
6. Arvatavasti on tulevikus võimalik ühendada TGR-geenimutatsiooni katse korduvdoosi toksilisuse uuringuga (käesoleva lisa peatükk B.7). Siiski on vaja veel andmeid selle tõendamiseks, et korduvdoosi toksikoloogia uuringus kasutatav lühem ühepäevane vahe dooside manustamise lõpu ja proovide võtmise vahel ei mõjuta TGR-geenimutatsiooni katseid, mille puhul kasutatakse 3päevast ajavahemikku. On vaja ka andmeid, mis näitaksid, et transgeense näriliselini kasutamine tavaliste näriliseliniinide asemel ei kahjusta korduvdoosi katse tulemusi. Kui need andmed saadakse, tuleb käesolevat katsemeetodit ajakohastada.
7. Peamiste terminite tähendused on esitatud liites.

LÄHTEKAALUTLUSED

8. TGR-geenimutatsiooni mudelsüsteemid, mille kohta on kogutud piisavalt andmeid, et toetada nende kasutamist käesolevas katsemeetodis, on järgmised: *lacZ*-bakteriofaag-hiir (MutaTMMouse); *lacZ*-plasmiid-hiir; *gpt*-delta- (*gpt*- ja *Spi*-)hiir ja -rott; *lacI*-hiir ja -rott (Big Blue®), kui katse tehakse standardtingimustes. Lisaks võib kasutada *cII*-positiivsevaliku katset, et hinnata mutatsioone Big Blue®- ja MutaTMMouse'i mudelites. Mutageneesi hinnatakse TGR-mudelite puhul tavaliselt mutantide sageduse järgi; vajaduse korral võib kasutada aga ka mutatsioonide molekulaaranalüüsi täiendava teabe saamiseks (vt punkt 24).
9. Need näriliste *in vivo* geenimutatsiooni katsed on eriti olulised mutageensuse ohu hindamisel, kuna katsete tulemused sõltuvad *in vivo* metabolismist, farmakokineetikast, DNA parandusprotsessidest ja DNA sünteesimehhanismi võimest kahjustusega toime tulla, kuigi need omadused võivad eri liikidel ja kudedel olla erinevad ja sõltuda ka DNA kahjustuse tüübist. *In vivo* meetod geenimutatsiooni täiendavaks uurimiseks on kasulik edasiseks uurimiseks, kui *in vitro* süsteemis on leitud mutageenne toime, samuti täiendavate *in vivo* näitajate väljaselgitamiseks (24). Lisaks sellele, et geenimutatsioonid on põhjuslikult seotud vähi tekkimisega, on need ka asjakohane näitaja muude mutatsioonipõhiste haiguste kui vähk (12, 13) ja pärilike haiguste tekkimise ennustamiseks.

10. Kui on tõendeid, et uuritav kemikaal või asjakohane metaboliit ei pääse mõne huvipakkuva koeni, siis ei ole transgeense närilise geenimutatsiooni katse asjakohane.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Punktis 8 kirjeldatud katsetes on sihtgeeniks bakteriaalse või bakteriofaagse päritoluga geen ning selle transgeeni närilise genoomsest DNAST väljaeraldamise vahendiks on transgeeni viimine λ -bakteriofaagisse või plasmiididesse süstikvektoris. Selleks ekstraheeritakse huvipakkuvast närilisekoest genoomne DNA, töödeldakse seda *in vitro* (süstikvektori taastamiseks pakendatakse λ -vektorid või ligeeritakse ja elektroporeeritakse plasmiidid) ja seejärel tehakse pärast peremeesorganismi (bakterisse) viimist sobivates tingimustes kindlaks mutatsioonid. Analüüsiks kasutatakse neutraalseid transgeene, mida saab enamikust kudedest hõlpsasti jälle välja võtta.
12. Tavaline TGR geenimutatsiooni katse hõlmab näriliste viimist teatavaks ajaks kokkupuutesse uuritava kemikaaliga. Kemikaale võib manustada mis tahes asjakohasel viisil, sealhulgas implantatsiooniga (nt meditsiiniseadme testimine). Kogu ajavahemikku, mille jooksul loomale manustatakse kemikaali, nimetatakse manustamisajaks. Manustamisele järgneb tavaliselt teatav aeg enne surmamist, mille jooksul kemikaali ei manustata ja mille jooksul parandata DNA-kahjustused fikseeruvad püsivateks stabiilseteks mutatsioonideks. Kirjanduses on seda ajavahemikku nimetatud mitmel viisil: avaldumisaeg, kinnistumisaeg või väljendumisaeg (*manifestation, fixation, expression*); see ajavahemik lõpeb proovivõtuajaga(15, 29). Kui loom on surmatud, eraldatakse huvipakkuvatest kudedest DNA ja puhastatakse.
13. Paljudest pakendamisest või ligeerimisest iga looma ühe koe kohta saadud andmed tavaliselt koondatakse ja muteerumise sagedus hinnatakse tavaliselt kokku 10^5 – 10^7 lüüsilaike või kolooniaid moodustava ühiku põhjal. Kui kasutatakse positiivseid selektsioonimeetodeid, määratakse lüüsilaike moodustavad ühikud eraldi mitteselektiivsete plaatidega.
14. Positiivsed selektsioonimeetodid on välja töötatud mutatsioonide avastamiseks nii *gpt*-geenis[*gpt*-delta-hiir ja -rott, *gpt*-fenotüüp (20, 22, 28)] kui ka *lacZ*-geenis [MutaTMMouse või *lacZ*-plasmiid-hiir (3, 10, 11, 30)]; samas *lacI*-geeni mutatsioone Big Blue®-loomades tuvastatakse mitteselektiivse meetodiga, milles mutante avastatakse värvunud (siniste) lüüsilaike tekkimise järgi. Positiivne selektsioonimeetod on loodud ka punktmutatsioonide avastamiseks λ -bakteriofaagsüstikvektori *cII*-geenis [Big Blue®-hiir või -rott ja MutaTMMouse (17)] ning deletsioonimutatsioonide leidmiseks λ *red* ja *gam* geenides [Spi-selektsioon *gpt*-delta-hiire ja -roti puhul (21, 22, 28)]. Mutatsioonisagedusarvutatakse transgeenis lüüsilaike/plasmiide sisaldavate mutatsioonide arvu jagamisel lüüsilaike/plasmiidide üldarvuga, mis on saadud samast DNA-proovist. Transgeense närilise geenimutatsiooni uuringute puhul esitatav näitaja on mutatsioonide sagedus. Lisaks sellele saab mutatsioonisageduse määrata sõltumatut mutatsiooni sisaldavate rakkude määrana; selle arvutuse jaoks on vaja eraldatud mutantide sekveneerimisega teha klooni kasvu arvestav parand(24).
15. Mutatsioonid, mis loendatakse *lacI*, *lacZ*, *cII* ja *gpt* punktmutatsioonide katsetes, kujutavad endast peamiselt alusepaari asenduse, raaminihke ning väikeste insertioonide ja deletsioonidega seotud mutatsioone. Selliste mutatsioonitüüpide suhteline osa spontaansete mutatsioonide hulgas sarnaneb selle piirkonna endogeenses HPRT-geeni tekkivate mutatsioonide suhtelise osaga. Suuri deletsioone avastatakse ainult Spi-selektsioonija *lacZ*-plasmidi katsetega (24). Huvipakuvad mutatsioonid on *in vivo* mutatsioonid, mis tekivad hiirtel või rottidel. *In vitro* ja *ex vivo* mutatsioonid, mis võivad tekkida faagi/plasmidi tagasisaamisel, replikatsioonil või parandamisel, on võrdlemisi haruldased ja mõnes süsteemis on neid võimalik spetsiifiliselt tuvastada või välistada bakteriaalse peremeesorganismi/positiivse selektsiooni süsteemiga.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

Loomaliigi valimine

16. Praegu on olemas mitmesuguseid transgeensete hiirte geenimutatsioonide tuvastamise mudeleid ja neid süsteeme kasutatakse laialdasemalt kui transgeense roti mudeleid. Kui rott on selgelt sobivam mudel kui hiir (nt kui uuritakse üksnes rottidel esineva kasvaja tekkimise mehhanismi, et korreleerida seda rottide puhul avalduva toksilisuse uuringuga, või kui metabolism rotis on teadaolevalt lähedasem metabolismile inimese organismis), siis tuleks kaaluda transgeense roti mudeli kasutamist.

Pidamis- ja söötmistingimused

17. Temperatuur katseloomade ruumis peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema hoida niiskust 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut koos piiramatul hulgal joogiveega. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Loomi tuleb pidada väikestes rühmades, kuni viis samast soost looma, kui ei eeldata agressiivset käitumist. Loomi võib hoida eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

18. Terved noored suguküpsuse saavutanud täiskasvanud loomad (vanus 8–12 nädalat katse alguses) määratakse juhuvaliku alusel kontrolli- ja doosirühmadesse. Loomad varustatakse individuaalse märgisega. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viis päeva. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Uuringu alguses peaksid loomade kehamaassi erinevused olema minimaalsed ja ei tohiks ületada ± 20 % kummagi soo keskmisest massist.

Dooside ettevalmistamine

19. Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspenderida sobivas lahustis või kandaines ja segada sööda või joogivee sisse enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat ainet võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist. Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värskeid valmistisi, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Katsetingimused*Lahusti/kandaine*

20. Lahusti/kandaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate dooside korral ega keemiliselt reageerida uuritava ainega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandainest erinevat lahustit või ainet, peab olema võrdlusandmetega näidatud, et see on sobiv. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahuste/vee kui kandaine kasutamist.

Positiivsed kontrollid

21. Tavaliselt tuleks kasutada paralleelselt positiivse kontrolli loomi. Labori puhul, kes on tõendanud oma pädevust (vt punkt 23) ja teeb selliseid katseid tavalises korras, võib meetodi edukuse tõenduseks lisada igasse katsesse DNA eelmisest positiivse kontrolli katsest. Selline varasema katse DNA peaks olema saadud sama loomaliigi samadest huvipakkuvatest kudedest ja see peaks olema nõuetekohaselt säilitatud (vt punkt 36). Kui kasutatakse samaaegset positiivset kontrolli, ei ole kontrollkemikaali vaja tingimata manustada samal viisil kui uuritavat kemikaali; siiski peaks positiivse kontrolli kemikaali kohta olema teada, et see põhjustab mutatsioone samas koes/samades kudedes, mis pakuvad huvi uuritava kemikaali puhul. Positiivse kontrolli kemikaali doosid tuleks valida nii, et mõju oleks nõrk või mõõdukas, et kriitiliselt hinnata katse tulemuslikkust ja tundlikkust. Positiivse kontrolli kemikaalide ja mõnede nende sihtkudede näited on esitatud tabelis 1.

Tabel 1

Positiivse kontrolli kemikaalide ja mõnede nende sihtkudede näited

Positiivse kontrolli kemikaal ja selle CASi nr	EINECSi nimetus ja EINECSi nr	Kirjeldus	Mutatsiooni sihtkude	
			Rott	Hiired
N-etüül-N-nitrosokarbamiid [CASi nr 759-73-9]	N-etüül-N-nitrosokarbamiid [212-072-2]	Otse toimiv mutageen	Maks, kopsud	Luuüdi, käärsool, käärsoolle epiteel, sool, maks, kopsud, põrn, neerud, munasarjade granulöösarakud, isaslooma sugurakud

Positiivse kontrolli kemikaal ja selle CASi nr	EINECSi nimetus ja EINECSi nr	Kirjeldus	Mutatsiooni sihtkude	
			Rott	Hiired
Etüülkarbamaat (uretaan) [CASi nr 51-79-6]	Ureetaan [200-123-1]	Mutageen, vajalik on metabolism, mõju on aga nõrk		Luuüdi, eelmagu, peen- sool, maks, kopsud, põrn
2,4-diaminotoluene [CASi nr 95-80-7]	4-metüül-m-fenüleen- diamiin [202-453-1]	Mutageen, vajalik on metabolism, positiivne ka Spi-katses	Maks	Maks
Benso[a]püreen [CASi nr 50-32-8]	Benso[def]krüseene [200-028-5]	Mutageen, vajalik on metabolism	Maks, rasvikud	Luuüdi, rinnanääre, käärsool, eelmagu, näärme-magu, süda, maks, kopsud, isas- looma sugurakud

Negatiivsed kontrollid

22. Igal proovide võtmisel peaksid olema negatiivsed kontrollid, loomad, kellele on manustatud ainult lahustit või kandeainet ja kes muidu on läbinud sama kohtlemise kui doosirühmad. Kui ei ole varasemaid või kirjanduses avaldatud kontrollandmeid, mis näitaksid, et valitud lahustil või kandeainel ei ole kahjulikku ega mutageenset toimet, tuleb igal proovide võtmisel kaasata ka loomad, kellele ei ole üldse midagi manustatud, et tõendada kandeaine kontrolli vastuvõetavust.

Labori pädevuse tõendamine

23. Pädevust nende katsete tegemiseks tuleks tõendada võimega korrata avaldatud andmete (24) vastavaid järgmisi oodatavaid tulemusi: 1) mutatsioonide sagedus positiivse kontrolli kemikaalide puhul (kaasa arvatud nõrgatoimelised kemikaalid), nagu tabelis 1 esitatud kemikaalid, mittemutageenide puhul ja kandeaine kontrolli puhul ning 2) transgeeni tagasisaamine genoomsest DNA-st (nt pakendamise tõhusus).

Mutantide sekveneerimine

24. Regulaativsete rakenduste puhul mutantide DNA sekveneerimist ei nõuta, eriti kui on saadud selge positiivne või negatiivne tulemus. Sekveneerimine võib siiski olla kasulik, kui individuaalsete loomade vahelised erinevused on suured. Sellistel juhtudel võib järjestuse määramist kasutada nn *jackpot*-i või kloonsete sündmuste võimaluse välis-
tamiseks: sekveneerimisega määratakse ainulaadsete mutatsioonide osakaal konkreetsetes koes. Ühe looma ühe koe ligikaudu 10 mutandi sekveneerimine peaks olema piisav, et lihtsalt kindlaks teha, kas kloonmutandid võivad anda panuse mutatsioonide sagedusse; mutatsioonisageduse andmete matemaatiliseks parandamiseks klooniefektide suhtes tuleks sekveneerida kuni 25 mutanti. Mutantide sekveneerimist võib kaaluda ka siis, kui leitakse mutatsioonisageduse nõrk suurenemine (st vaid veidi rohkem mutatsioone kui kontrollkatses, kus kemikaali ei manustatud). Kui kemikaali saanud ja kontrollkatse mutandikolooniate spekter on erinev, võib see toetada mutageense toime oletust (29). Mutatsioonide spektrid võivad olla abiks ka toimemehhanismi käsitlevate hüpoteeside tegemisel. Kui uuringus nähakse ette sekveneerimine, tuleb uuringu kavandamisel olla eriti hoolikas, eriti ühe proovi kohta sekveneeritavate mutantide arvu määramisel, et tulemusel oleks vastavalt kasutatavale statistilisele mudelile piisav statistiline võimsus (vt punkt 43).

KATSE KORRALDUS

Loomade arv ja sugu

25. Loomade arv igas rühmas peaks olema eelnevalt kindlaks määratud nii, et see tagaks piisava statistilise võimsuse, mis võimaldaks tuvastada vähemalt mutantide arvu kahekordistumise. Rühmas on vähemalt viis looma; kui statistiline võimsus ei ole piisav, tuleks loomade arvu vastavalt vajadusele suurendada. Tavaliselt tuleks kasutada isasloomi. Võib esineda juhtusid, kus on õigustatud üksnes emasloomade kasutamine, näiteks kui uuritakse spetsiaalselt naiste jaoks ettenähtud ravimeid või uuritakse naissoole eripäraseid metabolismi aspekte. Kui kemikaali toksilisuses või metabolismis esineb märkimisväärsed soospetsiifilisi erinevusi, on vaja uurida nii isas- kui ka emasloomi.

Manustamisperiood

26. Kuna on kindlaks tehtud, et mutatsioonid akumul eeruvad iga manustamiskorraga, on vaja kasutada korduvdoosi manustamise režiimi — manustamist iga päev 28 päeva jooksul. Seda peetakse üldiselt rahuldavaks, kuna niimoodi tekib ka nõrga mutageeniga piisavalt palju mutatsioone ja see on piisav kokkupuuteaeg mutatsioonide avastamiseks aeglaselt kasvavates organismides. Mõne hindamise puhul võib olla sobiv muu manustamisrežiim, mille kasutamist tuleks uuringu protokollis teaduslikult põhjendada. Kemikaali manustamise aeg ei tohiks olla lühem kui aeg, mis on vajalik kõikide asjakohaste metabolismiensüümide täielikuks induksiooniks; lühema manustamisperioodi puhul võib olla vaja kasutada mitut proovide võtmise aega, mis sobivad eri kasvukiirusega organite jaoks. Igal juhul tuleks katse-eeskirja põhjendamiseks kasutada kogu kättesaadavat teavet (nt üldise toksilisuse, metabolismi ja farmakokineetika kohta), eriti kui kaldutakse kõrvale eespool esitatud standardsoovitustest. Pikemat manustamisperioodi kui 8 nädalat tuleks selgelt põhjendada ja õigustada, sest kuigi see võib suurendada katse tundlikkust, võib see põhjustada mutantide sageduse näilist suurenemist klooni kasvu tagajärjel (29).

Doositasemed

27. Doositasemed peaksid põhinema tulemustel, mis on saadud doosivahemiku leidmise katsega, milles mõõdetakse üldist mürgisust samasuguse manustamis- või kokkupuuteviisi puhul, või varasemate alaägeda mürgistuse uuringute tulemustel. Doosivahemiku leidmiseks võib kasutada sama näriliseliini mitte-transgeenseid loomi. Doosi ja toime vahelist seost käsitleva teabe saamiseks peaks täielikus põhikatses olema negatiivne kontrollrühm (vt punkt 22) ja vähemalt kolm sobiva vahemikuga doositaset, välja arvatud juhul, kui kasutatakse piirdoosi (vt punkt 28). Suurim doos peaks vastama suurimale talutavale doosile. Suurim talutav doos on doos, mis põhjustab selliseid mürgistusenähte, et sama manustamiskava puhul põhjustaks veel suurem doos juba surma. Kemikaalid (näiteks hormoonid ja mitogeenid), millel juba madala mittetoksilise doosi juures on teatav bioloogiline aktiivsus, ja sellised kemikaalid, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumine, moodustavad erandi üldistest doosivaliku kriteeriumidest ja neid tuleks igal juhul hinnata konkreetselt. Doositasemetega tuleks katta kogu vahemik suurimast talutavast doosist kuni vähese mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni.

Piirdoosikatse

28. Kui doosivahemiku leidmise katsed või lähedaste näriliseliinide andmed osutavad, et vähemalt piirdoosi manustamine ei põhjusta närilisele täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui struktuurilt lähedaste kemikaalide andmete põhjal ei ole karta genotoksilisust, ei tarvitse täielik uuring kolme doositasemega olla vajalik. 28-päevase manustamisperioodi (28 manustamist üks kord päevas) puhul on piirdoos 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas. Kui manustamisperiood on 14 päeva või lühem, on piirdoos 2 000 mg kehakaalu kg kohta päevas (dooside manustamise kavad, mis erinevad 28-päevasest manustamisest, peaksid olema katseprotokollis teaduslikult põhjendatud; vt punkt 26).

Dooside manustamine

29. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt sundsöötmisega maosondi kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Üldiselt tuleks katse kavandamisel silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seepärast võib kasutada muid kokkupuuteviise (näiteks joogiveega, nahaaluse süstiga, intravenoosselt, nahale määrimisega, sissehingamisega, trahheasse juhtimisega, söödaga või implantaadiga), kui neid saab põhjendada. Süstimist kõhukelmesse ei soovitata, kuna see ei ole inimese kokkupuute seisukohast asjakohane. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema mahu kasutamise korral tuleb seda põhjendada. Välja arvatud ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide dooside korral jääks samaks.

Proovivõtuaeg

Somaatilised rakud

30. Proovide võtmise aeg on väga oluline muutuja, sest see on määratud ajavahemikuga, mis kulub mutatsioonide fikseerumiseks. See ajavahemik on koespetsiifiline ja näib olevat seotud rakupopulatsiooni uuenemisajaga; luuüdi ja soolestiku puhul on toime kiire, maksa puhul on see palju aeglasem. Sobiv kompromiss mutatsioonisageduse mõõtmiseks nii kiiresti kui ka aeglaselt kasvavate kudede korral on manustamine 28 järjestikusel päeval

(vt punkt 26) ja proovide võtmine kolm päeva pärast viimast manustamist, kuigi maksimaalne mutantide sagedus ei tarvitse nendes tingimustes aeglaselt kasvavate kudede puhul veel avalduda. Kui aeglaselt kasvavad koed on eriti olulised, võib hilisem proovide võtmise aeg 28 päeva pärast 28-päevase manustamisperioodi lõppu olla kohasem (16, 29). Sellisel juhul asendaks hilisem proovivõtuaeg proovide võtmise pärast kolme päeva, ning see nõuaks teaduslikku põhjendust.

Sugurakud

31. Transgeense närilise katse sobib hästi isaslooma sugurakkudes põhjustatud mutatsioonide uurimiseks (7, 8, 27), kuna spermatogeneesi ajastust ja kineetikat on palju uuritud (27). Analüüsiks kättesaadavate munarakkude väike arv, isegi pärast superovulatsiooni, ning asjaolu, et munarakus ei toimu DNA sünteesi, välistavad transgeense närilise katse kasutamise mutatsioonide tekkimise uurimiseks emaslooma sugurakkudes (31).
32. Proovide võtmise aeg isaslooma sugurakkude puhul valitakse nii, et proovid kogutakse kõikidest kogu suguraku arengutsükli jooksul kemikaaliga kokkupuutunud rakutüüpidest; jälgitakse, et see staadium, mille proove eriti tahetakse saada, oleks piisavalt kaua kemikaaliga kokku puutunud. Aeg, mis kulub arenevatel sugurakkudel jõudmiseks spermatogooniumi tüvirakkudest küpse spermatoosoidi staadiumini seemnejuhas või munandimanuse sabas, on ~49 päeva hiire (36) ja ~70 päeva roti (34, 35) puhul. Sperma, mis kogutakse pärast 28-päevast kokkupuuteperioodi ja sellele järgnevat kolmepäevast ajavahemikku proovide võtmiseni seemnejuhas ja munandimanuse sabast (7, 8), kujutab endast rakkude populatsiooni, mis on olnud kemikaaliga kokkupuutes umbes poole spermatogeneesi ajast; see spermatogeneesi lõpp-periood hõlmab meioosi ja sellele järgnevaid etappe, kuid ei hõlma spermatogooniumi- ega tüvirakuetappi. Selleks, et saada seemnejuhas ja munandimanuse sabast õigeid proove rakkudest, mis olid spermatogooniumi tüvirakud kokkupuuteperioodi ajal, tuleb pärast kemikaali manustamise lõppu proovide võtmisele eelnevale ajale lisada hiire puhul vähemalt 7 nädalat ja roti puhul 10 nädalat.
33. Pärast 28 + 3 päeva pikkust katseperioodi seemnekanalikestest väljasurutud rakud kujutavad endast segapopulatsiooni, milles on kõiki sugurakkude arengu staadiume (7, 8). Nendest rakkudest proovide võtmine geenimutatsioonide avastamiseks ei võimalda nii täpselt hinnata, millistes suguraku arengu etappides tekivad mutatsioonid, kui seemnejuhas või munandimanuse sabast kogutud spermatoosoidiproovid (kuna seemnekanalikestest saadud proovis on palju sugurakutüüpe ja ka somaatilisi rakke, mis saastavad seda rakupopulatsiooni). Kuid rakuproovi võtmine seemnekanalikestest lisaks spermatoosoidiproovile seemnejuhas või munandimanuse sabast pärast üksnes 28 + 3 päeva pikkust katseperioodi võimaldab saada mingid proovid kõikidest rakkudest, mis on olnud kemikaaliga kokkupuutes enamiku suguraku küpsemise faaside ajal, ja see võib olla kasulik mõnede suguraku mutageenide tuvastamiseks.

Vaatlused

34. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, soovitatavalt iga kord samal ajal ning võttes arvesse, et oodatud tulemusi esineb kõige rohkem pärast doseerimist. Üles tuleks märkida loomade tervislik seisund. Vähemalt kaks korda päevas tuleks kontrollida, ega loomad ei ole haigestunud või surnud. Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas ja surmamisel. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel leitakse raske mürgistuse tunnuseid, mis ei ole küll surmavad, tuleks humaanselt surmata enne katse lõppu (23).

Kudede kogumine

35. Kudede kogumise põhjendus peaks olema selgelt määratletud. Kuna mutatsioonide tekkimist on võimalik uurida peaaegu igas koes, peaks kogutavate kudede valimine põhinema uuringu tegemise eesmärgil ja kõikidel uuritava kemikaali kohta saadud mutageensuse, kantserogeensuse ja mürgisuse andmetel. Olulised tegurid, mida tuleks kaaluda, peaksid hõlmama vähemalt järgmist: manustamisviis (põhineb inimeste töenäolisel kokkupuuteviisil), jaotumine kudedes ja võimalik toimemehhanism. Taustteabe puudumise korral tuleks koguda paljusid somaatilisi kudesid, kuna need võivad pakkuda huvi. Nende hulgas peaks olema kiiresti kasvavaid, aeglaselt kasvavaid ja kokkupuutekohasid kudesid. Lisaks tuleks koguda spermatoosoidide seemnejuhas ja munandimanuse sabast ning arenevaid sugurakke seemnekanalikestest (nagu on kirjeldatud punktides 32 ja 33) ja säilitada hilisema analüüsi jaoks, kui on vaja määrata mutageensust sugurakkude suhtes. Tuleks määrata elundite massid ja suuremate elundite puhul tuleks kõikidelt loomadelt koguda üks ja sama piirkond.

Kudede ja DNA säilitamine

36. Kudesid või nende homogeneate tuleb säilitada temperatuuril alla $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ja kasutada DNA eraldamiseks viie aasta jooksul. Eraldatud DNA, mida säilitatakse temperatuuril $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobivas puhverlahuses, tuleks kasutada mutatsioonide analüüsiks 1 aasta jooksul.

Kudede valimine mutantide analüüsiks

37. Kudede valimisel tuleks arvestada järgmist: 1) manustamistee või esimese kokkupuute koht (nt näärmemagu suukausel manustamisel, kopsud sissehingamisega manustamisel, nahk, kui määratakse nahale) ja 2) farmakokiineetilised näitajad, mida vaadeldakse üldistes mürgisuse uuringutes, mis näitavad levikut kudedesse, püsivust kudedes või kogunemist kudedesse, samuti mürgisuse sihtorganid. Kui uuring tehakse kantserogeensusuuringu jätkuna, tuleks arvestada kantserogeensuse sihtkudesid. Analüüsi jaoks kudede valimisel tuleks seada eesmärgiks selliste kemikaalide tuvastamine, mis on otse toimivad *in vitro* mutageenid, mis kiiresti metaboliseeritakse, on väga reaktsioonivõimelised või neelduvad halvasti või mille sihtkude on määratud manustamisteedega (6).
38. Kui taustteavet ei ole ning võttes arvesse kokkupuute kohta, mis on määratud manustamisviisiga, tuleks mutageenust hinnata maksa ja vähemalt ühe kiiresti jaguneva koe (nt näärmemagu, luuüdi) järgi. Enamikul juhtudel võib eespool nimetatud nõuded täita kahe hoolikalt valitud koe analüüsiga, kuid mõnel juhul oleks vaja analüüsida kolme või enam kude. Kui on põhjust eriti muretseda mõju pärast sugurakkudele, sealhulgas positiivse tulemuse pärast somaatilistes rakkudes, tuleks mutatsioonide suhtes uurida sugurakkude kudesid.

Mõõtmismeetodid

39. Standardsed avaldatud laborimeetodid mutantide avastamiseks on kättesaadavad järgmiste soovitatavate transgeenimudelite jaoks: *lacZ* λ-bakteriofaag ja -plasmiid (30); *lacI* hiir (2, 18); *gpt* delta hiir (22); *gpt* delta rott (28); *cII* (17). Muudatused peavad olema nõuetekohaselt põhjendatud ja dokumenteeritud. Mitme pakendi andmed saab koondada ja kasutada selleks, et saavutada piisav arv lüüsilaike või kolooniaid. Kui vajaliku arvu lüüsilaike saamiseks on vaja suurt arvu pakendamisreaktsioone, võib see näidata DNA halba kvaliteeti. Sellisel juhul tuleks andmeid hoolikalt kaaluda, kuna need ei tarvitse olla usaldusväärsed. Lüüsilaike või kolooniate optimaalne koguarv DNA-proovi kohta on määratud statistilise tõenäosusega, et õnnestub kindlaks teha piisav arv mutante teatava spontaanse mutatsioonisageduse juures. Üldiselt on vaja vähemalt 125 000 — 300 000 lüüsilaiku, kui spontaanne mutatsioonisagedus on suurusjärgus 3×10^{-5} (15). Big Blue® *lacI* katse puhul on oluline näidata, et kogu mutantide värvusfenotüüpide vahemikku saab avastada; selleks lisatakse sobivad värvuse kontrollid paralleelselt igale plaadile. Koed ja saadavad proovid (näidised) tuleks töödelda ja analüüsida plokk skeemi alusel, milles lahusti/kandeaine kontrollrühma, positiivse kontrolli rühma (kui seda kasutatakse) või positiivse kontrolli DNA (kui see on asjakohane) ja iga doosirühma näidised töödeldakse koos.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmete töötlemine

40. Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabeli kujul. Katseühikuks on loom. Protokolilis tuleks esitada lüüsilaike moodustavate ühikute (*plaque-forming units*, PFU) või kolooniaid moodustavate ühikute (*colony-forming units*, CFU) koguarv, mutantide arv ja mutatsioonide sagedus iga looma iga koe puhul. Kui tegemist on paljude pakendamise- või vabastamisreaktsioonidega, tuleks esitada reaktsioonide arv iga DNA-näidise kohta. Andmed iga üksiku reaktsiooni kohta tuleks säilitada, kuid protokolilis on vaja esitada ainult vaid PFU-de või CFU-de üldarv. Tuleks esitada andmed mürgisuse kohta ja kliinilised tunnused, vt punkt 34. Iga analüüsitud mutandi puhul tuleb esitada kõik sekveneerimisandmed, samuti nendest tulenevad mutatsioonisageduse andmed iga looma ja iga koe kohta.

Tulemuste statistiline hindamine ja tõlgendamine

41. On mitmeid kriteeriume positiivse tulemuse määramiseks, nagu muteerumissageduse suurenemine sõltuvalt kemikaali doosist või mutatsioonide sageduse selge suurenemine ühes doosirühmas, võrreldes lahusti/kandeaine kontrollrühmaga. Doosi-toime sõltuvuse jaoks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme doosirühma. Peamine arvesse võetav tegur on tulemuste bioloogiline asjakohasus, kuid katsetulemuste hindamiseks võib kasutada sobivaid statistilisi meetodeid (4, 14, 15, 25, 26). Kasutatavate statistiliste testide korral tuleks eksperimendiühikuks pidada üksiklooma.

42. Uuritavat kemikaali, millega saadavad tulemused ühegi koe puhul ei vasta eespool esitatud kriteeriumidele, peetakse käesoleva katsemeetodi kohaselt negatiivseks. Et negatiivset tulemust saaks pidada bioloogiliselt asjakohaseks, tuleks koe kokkupuudet kemikaaliga tõendada.
43. DNA sekveneerimisanalüüsides puhul võib tulemuste tõlgendamisel kasutada mitmeid statistilisi lähenemisviise (1, 5, 9, 19).
44. Toime bioloogilise olulisuse hindamisel võib juhinduda sellest, kas leitud väärtused on varasemate kontrollkatsete vahemikus või väljaspool seda vahemikku (32).

Katseprotokoll

45. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- identifitseerimisandmed ja CASi nr, kui see on teada;
- allikas, partii number, kui on olemas;
- füüsikaline olek ja puhtus;
- uuringu tegemisel olulised füüsikalise-keemilised omadused;
- uuritava kemikaali stabiilsus, kui see on teada.

Lahusti/kandaine:

- kandaine valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandaines, kui on teada;
- sööda, joogivee või sissehingamise kaudu manustamiseks sobiva vormi valmistamine;
- osutatud vormi analüüsid (nt, stabiilsus, ühtlus, nominaalsed kontsentratsioonid).

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, sööt jne;
- iga looma mass katse alustamisel, sh kehamassi vahemik, keskvärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

- positiivseid ja negatiivseid (lahus/kandaine) kontrollkatseid käsitlevad andmed;
- vahemiku leidmise uuringu andmed;
- doositaseme valimise põhjendus;
- uuritud kemikaali preparaadi üksikasjad;
- uuritud kemikaali manustamise üksikasjad;
- manustamistee põhjendus;
- looma suhtes avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas histopatoloogilised või hematoloogilised analüüsid, kui need on tehtud, ja loomade vaatluste ja kehamassi määramise sagedus;
- meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis sihtkoesse või üldvereringesse, kui tulemused olid negatiivsed;
- tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/joogivee tarbimise ja selles uuritava kemikaali sisalduse (ppm) järgi, kui see on kohaldatav;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus ja nende valiku põhjendused;

- humaanse surmamise meetod;
- kudede eraldamise ja säilitamise kord;
- näriliste genoomse DNA eraldamise, transgeeni genoomsest DNA-st vabastamise ja transgeense DNA bakteriaalsesse peremeesorganismi ülekandmise meetodid;
- kõikide rakkude, katsekomplektide ja reaktiivide allikad ja partiide numbrid (vajaduse korral);
- mutantide loendamine meetodid;
- mutantide molekulaarse analüüsi, kloonsuse paranduse kasutamise ja mutatsioonide sageduse arvutamise meetodid, kui see on kohaldatav.

Tulemused:

- loomade seisund enne katset ja kogu katse ajal, sealhulgas mürgistuse tunnused;
- keha ja elundite massid surmamisel;
- iga koe ja looma kohta mutantide arv, hinnatud lüüsilaiakude või kolooniate arv, mutatsioonide sagedus;
- iga koe ja loomade rühma kohta pakendamisreaktsioonide arv DNA proovi kohta, mutantide üldarv, keskmine muteerumissagedus, standardhälve;
- doosi ja toime suhe, võimaluse korral;
- iga koe ja looma kohta sõltumatute mutantide arv ja keskmine mutatsioonisagedus, kui tehti mutatsioonide molekulaarne analüüs;
- paralleelsed ja varasemad negatiivse kontrolli andmed, nende vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;
- paralleelse positiivse kontrolli (või mitteparalleelse positiivse kontrolli DNA) andmed;
- analüütilised määramised, kui need on kättesaadavad (nt DNA kontsentratsioon, mida kasutati pakendamisel, DNA sekveneerimise andmed);
- kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

KIRJANDUS

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

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

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

Liide

MÕISTED

Alusepaari asendumine – mutatsioonitüüp, mille tulemusel üksainus DNA nukleotiidipaar asendub muu nukleotiidipaariga.

Cos-sait – 12 nukleotidi pikkune üheaahelaline DNA-lõik, mis asub λ-bakteriofaagi kaheaahelalise genoomi mõlemas otsas.

Deletsioon – mutatsioon, millega genoomist läheb kaduma üks nukleotiid või (järjestikuste) nukleotiidide lõik.

Ekstrabinomiaalne variatsioon – populatsiooni osatähtsuse korduvate hindamiste suurem varieeruvus, kui võiks oodata juhul, kui populatsioonil on binomiaaljaotus.

Elektroporeerimine – elektriimpulsside kasutamine rakumembraanide läbilaskvuse suurendamiseks.

Endogeenne geen – genoomile algselt omane geen.

Insertsioon – genoomile ühe nukleotiidse alusepaari või (järjestikuste) nukleotiidsete alusepaaride lõigu lisamine.

Jackpot – suur arv mutante, mis on tekkinud ühestainsast mutatsioonist klooni kasvu tulemusel.

Kapsiid – valgukest, mis ümbritseb viiruseosakest.

Kemikaal – aine või segu.

Klooni kasv – paljude rakkude tekkimine ühestainsast (muteerunud) rakust.

Kolooniaid moodustav ühik (*colony-forming unit*, CFU) – eluvõimeliste bakterite arvu näitav suurus.

Konkatameer – pikk pidev biomolekul, mis koosneb paljudest ahelaks ühendatud ühesugustest koopiatest.

Ligeerimine – DNA-molekulide kahe otsa kovalentne linkimine DNA-ligaasi toimel.

Lüüsilaukused moodustav ühik (*plaque forming unit*, PFU) – eluvõimeliste bakteriofaagide arvu näitav suurus.

Manustamisperiood – kogu ajavahemik, mille jooksul loomale manustatakse kemikaalidoose.

Mitogeen – kemikaal, mis stimuleerib rakku alustama jagunemist ja käivitab sellega mitoosi (raku jagunemise).

Neutraalne geen – geen, mida ei mõjuta ei positiivne ega negatiivne selektsiooniline surve.

Pakendamine – nakatamisvõimeliste faagiosakeste sünteesimine faagi kapsiidi ja faagi saba valkude valmistisest ning faagi DNA-molekulide konkatameerist. Kasutatakse tavaliselt kloonitud DNA pakendamiseks λ-vektoris (mis on eraldatud cos-saitidega), et saada nakatamisvõimelised λ-osakesed.

Pakendamise tõhusus – tõhusus, millega pakendatud bakteriofaagid leitakse peremeesbakterites.

Positiivne selektsioon – meetod, mille puhul jäetakse ellu üksnes mutandid.

Proovivõtuaeg – surmamisele eelneva ajavahemiku lõpp, mille kestel kemikaali ei manustata ja parandamata DNA-kahjustused fikseeruvad püsivateks stabiilseteks mutatsioonideks.

Punktmutatsioon – üldine termin, millega tähistatakse üksnes väikses DNA-lõigus toimunud mutatsiooni, hõlmab insertsioone, deletsioone ja alusepaari asendumisi.

Raaminihke mutatsioon – geneetiline mutatsioon, mis tekib valku või peptiidi kodeerivas DNA-järjestuses, kui insertsiooniga on lisatud või deletsiooniga eemaldatud selline arv nukleotide, mida ei saa jäägita jagada kolmega.

Reportergeen – geen, mille mutantne geenisaadus on kergesti avastatav.

Suur deletsioon – DNA-st mitme tuhande alusepaari väljalangemine (mida saab tõhusalt kindlaks teha Spi-selektsiooni ja lacZ-plasmidi katsega).

Süstikvektor – selliselt konstrueeritud vektor, mis saab paljuneda kahes erinevas peremeesliigis; tänu sellele saab süstikvektoris sisestatud DNA-d tuvastada või muuta kahes erinevat tüüpi rakus või kahes erinevas organismis.

Transgeenne – iseloomustab organismi, mille genoomi on muudetud sellesse muu liigi geeni või geenide sisseviimisega, või on sellega seotud.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.”
