Dziennik Urzędowy L 247

Unii Europejskiej

Tom 57

Wydanie polskie **Legislacja** 21 sierpnia 2014

Spis treści

II *Akty o charakterze nieustawodawczym*

ROZPORZĄDZENIA

★ **Rozporządzenie Komisji (UE) nr 900/2014 z dnia 15 lipca 2014 r. zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)** [1] 1

[1] Tekst mający znaczenie dla EOG

PL

Akty, których tytuły wydrukowano zwykłą czcionką, odnoszą się do bieżącego zarządzania sprawami rolnictwa i generalnie zachowują ważność przez określony czas.

Tytuły wszystkich innych aktów poprzedza gwiazdka, a drukuje się je czcionką pogrubioną.

II

(Akty o charakterze nieustawodawczym)

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 900/2014

z dnia 15 lipca 2014 r.

zmieniające, w celu dostosowania do postępu technicznego, rozporządzenie (WE) nr 440/2008 ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 18 grudnia 2006 r. w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH), utworzenia Europejskiej Agencji Chemikaliów, zmieniające dyrektywę 1999/45/WE oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 793/93 i rozporządzenie Komisji (WE) nr 1488/94, jak również dyrektywę Rady 76/769/EWG i dyrektywy Komisji 91/155/EWG, 93/67/EWG, 93/105/WE i 2000/21/WE [1], w szczególności jego art. 13 ust. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

(1) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008 [2] zawiera metody badań służące określaniu właściwości fizykochemicznych, toksyczności oraz ekotoksyczności substancji chemicznych, które należy stosować do celów rozporządzenia (WE) nr 1907/2006.

(2) Należy zaktualizować rozporządzenie (WE) nr 440/2008 celem priorytetowego uwzględnienia przyjętych niedawno przez OECD nowych i zaktualizowanych metod badawczych, aby uwzględnić postęp techniczny oraz aby zapewnić zmniejszenie liczby zwierząt wykorzystywanych do celów doświadczalnych, zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE [3]. W sprawie tego projektu przeprowadzono konsultacje z zainteresowanymi stronami.

(3) Przedmiotowe dostosowanie do postępu technicznego obejmuje sześć nowych metod badawczych służących określaniu toksyczności i innych skutków dla zdrowia, w tym badanie neurotoksyczności rozwojowej, przedłużone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia, transgeniczny test *in vivo* mutacji genowej u gryzoni, badanie *in vitro* służące ocenie wpływu na syntezę hormonów sterydowych oraz dwie metody *in vivo* służące ocenie działań estrogennych i (anty)androgennych.

(4) Należy zatem odpowiednio zmienić rozporządzenie (WE) nr 440/2008.

(5) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią komitetu ustanowionego na mocy art. 133 rozporządzenia (WE) nr 1907/2006,

---

[1] Dz.U. L 396 z 30.12.2006, s. 1.

[2] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 440/2008 z dnia 30 maja 2008 r. ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów (REACH) (Dz.U. L 142 z 31.5.2008 s. 1).

[3] Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 2

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie trzeciego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 15 lipca 2014 r.

W imieniu Komisji
José Manuel BARROSO
Przewodniczący

ZAŁĄCZNIK

W załączniku do rozporządzenia (WE) nr 440/2008 wprowadza się następujące zmiany:

dodaje się rozdziały B.53, B.54, B.55, B.56, B.57 i B.58 w brzmieniu:

„B.53. **BADANIE NEUROTOKSYCZNOŚCI ROZWOJOWEJ**

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 426 (2007 r.). W czerwcu 1995 r. w Kopenhadze grupa robocza OECD ds. toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej omawiała potrzebę aktualizacji istniejących wytycznych OECD dotyczących badań w zakresie toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej oraz opracowania nowych wytycznych w odniesieniu do punktów końcowych, których jeszcze nie uwzględniono (1). Grupa robocza zaleciła opracowanie dotyczącej badań wytycznej w zakresie neurotoksyczności rozwojowej na podstawie wytycznej amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska, która została już poprawiona (2). W czerwcu 1996 r. w Kopenhadze odbyło się drugie spotkanie konsultacyjne, którego celem było dostarczenie Sekretariatowi wskazówek dotyczących konspektu nowej dotyczącej badań wytycznej w zakresie neurotoksyczności rozwojowej, w tym jej najbardziej istotnych elementów, np. szczegółów dotyczących doboru gatunków zwierząt, okresu dawkowania, okresu badania, punktów końcowych podlegających ocenie i kryteriów oceny wyników. Amerykańska wytyczna dotycząca oceny ryzyka neurotoksyczności została opublikowana w 1998 r. (3). Spotkanie konsultacyjne ekspertów OECD i warsztaty prowadzone przez Risk Science Institute przy ILSI odbyły się równolegle w październiku 2000 r., a spotkanie konsultacyjne ekspertów odbyło się w Tokio w 2005 r. Spotkania te miały na celu omówienie kwestii naukowych i technicznych związanych z aktualnymi wytycznymi dotyczącymi badań, a zalecenia, które były ich wynikiem (4)(5)(6)(7), uwzględniono w opracowaniu przedmiotowej metody badawczej. Dodatkowe informacje dotyczące procedury, interpretacji i terminologii stosowanej w przypadku tej metody badawczej można znaleźć w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 43 »Reproductive Toxicity Testing and Assessment« (Badanie i ocena toksyczności reprodukcyjnej) (8) oraz nr 20 »Neurotoxicity Testing« (Badanie neurotoksyczności) (9).

USTALENIA WSTĘPNE

2. Znany jest szereg substancji chemicznych, które prowadzą do neurotoksyczności rozwojowej u ludzi i innych gatunków (10)(11)(12)(13). Określenie potencjału wywoływania neurotoksyczności rozwojowej może być niezbędne do oceny i zbadania toksycznych cech charakterystycznych substancji chemicznej. Badania neurotoksyczności rozwojowej mają na celu dostarczanie danych, w tym charakterystyki dawka-odpowiedź, dotyczących potencjalnych skutków czynnościowych i morfologicznych dla rozwijającego się układu nerwowego potomstwa, które mogą powstać w wyniku narażenia *in utero* i we wczesnym stadium życia.

3. Badanie neurotoksyczności rozwojowej można prowadzać jako oddzielne badanie włączone do badania toksyczności reprodukcyjnej lub badania neurotoksyczności u dorosłych osobników (np. metody badawcze B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)), lub w powiązaniu z badaniem przedurodzeniowej toksyczności rozwojowej (np. z metodą badawczą B.31 (17)). Jeżeli badanie neurotoksyczności rozwojowej jest włączone do innego badania lub z nim powiązane, konieczne jest zachowanie integralności obu rodzajów badań. Wszystkie badania powinny być zgodne z mającymi zastosowanie przepisami lub wytycznymi rządowymi i instytucjonalnymi, dotyczącymi wykorzystywania zwierząt doświadczalnych w badaniach (np. 18).

4. Laboratorium badawcze powinno uwzględnić wszystkie dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej przed przystąpieniem do badania. Informacje te powinny obejmować tożsamość i strukturę chemiczną substancji, jej właściwości fizykochemiczne; wyniki wszystkich innych badań toksyczności *in vitro* lub *in vivo* przeprowadzonych na substancji, dane toksykologiczne substancji chemicznych zbliżonych pod względem budowy oraz przewidywane zastosowanie (zastosowania) tej substancji. Informacje te są niezbędne dla przekonania wszystkich zainteresowanych stron, że badanie dotyczy ochrony zdrowia ludzi i jest pomocne w wyborze odpowiedniej dawki wyjściowej.

ZASADA BADANIA

5. Badaną substancję chemiczną podaje się zwierzętom przez okres ciąży i laktacji. Badania prowadzi się na matkach, aby ocenić skutki dla samic w okresie ciąży i laktacji oraz aby mieć możliwość uzyskania informacji porównawczych (matki w porównaniu z potomstwem). Do oceny neurotoksyczności potomstwo dobiera się losowo z miotu. Ocena polega na obserwacji mającej na celu wykrycie poważnych anomalii neurologicznych i behawioralnych, w tym na ocenie rozwoju fizycznego, rozwoju zachowań, aktywności ruchowej, funkcji motoryczno-sensorycznych, uczenia się i pamięci, ocenie mas mózgów i ocenie neuropatologicznej w okresie rozwoju pourodzeniowego i dorosłości.

6. Jeżeli metodę badawczą stosuje się jako odrębne badanie, można wykorzystać dodatkowe, dostępne zwierzęta z każdej grupy w celu przeprowadzenia szczegółowych procedur neurobehawioralnych, neuropatologicznych, neurochemicznych lub elektrofizjologicznych, które mogą uzupełnić dane otrzymane w badaniach zalecanych w ramach niniejszej metody (16)(19)(20)(21). Procedury uzupełniające mogą być szczególnie użyteczne w przypadkach, gdy obserwacje empiryczne, przewidywane skutki lub mechanizm/sposób działania wskazują na jakiś szczególny rodzaj neurotoksyczności. Te procedury uzupełniające można stosować zarówno w przypadku matek, jak i młodych. Ponadto można również stosować procedury *ex vivo* lub *in vitro*, o ile nie zmienią one integralności procedur *in vivo*.

PRZYGOTOWANIA DO BADANIA

Wybór gatunków zwierząt

7. Badania najlepiej jest przeprowadzać na szczurach; w stosownych przypadkach można wykorzystać inne gatunki. Należy jednak pamiętać, że liczba dni ciąży i liczba dni okresu postnatalnego określone w tej metodzie są charakterystyczne dla powszechnie stosowanych szczepów szczurów i w związku z tym należy dobrać porównywalne liczby dni w przypadku wykorzystania innego gatunku lub nietypowego szczepu. Należy uzasadnić wykorzystanie innego gatunku na podstawie danych toksykologicznych, farmakokinetycznych lub innych. Uzasadnienie powinno obejmować dostępne, określone dla gatunku oceny neurobehawioralne i neuropatologiczne przeprowadzone w okresie pourodzeniowym. Jeżeli wcześniej miało miejsce badanie, które wzbudziło zaniepokojenie, należy uwzględnić gatunek/szczep, w odniesieniu do którego miało to miejsce. Ze względu na zróżnicowane, związane z badaniami cechy różnych szczepów szczurów powinien istnieć dowód, że wybrany do badania szczep charakteryzuje się odpowiednią płodnością i zdolnością reagowania. Należy udokumentować wiarygodność i czułość innych gatunków pod względem wykrywania neurotoksyczności rozwojowej.

Warunki trzymania i żywienia

8. Temperatura w badawczych pomieszczeniach hodowlanych powinna wynosić 22 ± 3 °C. Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i najlepiej byłoby, gdyby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, docelowy poziom wilgotności powinien wynosić 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Możliwe jest również odwrócenie cyklu światła przed kryciem i na okres trwania badania w celu przeprowadzenia oceny funkcjonalnych i behawioralnych punktów końcowych w fazie nocy (przy oświetleniu czerwonym światłem), tj. w czasie, gdy zwierzęta są zwykle aktywne (22). Wszelkie zmiany w cyklu dzień/noc powinny uwzględniać odpowiedni czas aklimatyzacji aby zwierzęta mogły przystosować się do nowego cyklu. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Należy zgłosić rodzaj pokarmu i wodę i przebadać je pod kątem zanieczyszczeń.

9. Zwierzęta mogą być trzymane pojedynczo lub umieszczane w klatkach w małych grupach o tej samej płci. Procedury krycia powinny być przeprowadzane w klatkach nadających się do tego celu. Po stwierdzeniu, że kopulacja nastąpiła, lub nie później niż w 15 dniu ciąży, pokryte zwierzęta powinny być umieszczone oddzielnie w klatkach porodowych lub matczynych. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Tuż przed porodem należy zapewnić pokrytym samicom właściwe i określone materiały do budowy gniazda. Wiadomo powszechnie, że nieodpowiednie obchodzenie się ze zwierzęciem lub stres w czasie ciąży mogą pociągać za sobą niepożądane skutki, w tym straty przedurodzeniowe, wadliwy rozwój płodu i wadliwy rozwój pourodzeniowy. W celu ochrony przed stratą płodu spowodowaną czynnikami niezwiązanymi z doświadczeniem należy ostrożnie postępować ze zwierzętami w czasie ciąży i chronić je przed stresem wywoływanym czynnikami zewnętrznymi, takimi jak nadmierny hałas na zewnątrz.

Przygotowanie zwierząt

10. Należy wykorzystywać zdrowe zwierzęta zaaklimatyzowane do warunków laboratoryjnych i niepoddawane wcześniej procedurom doświadczalnym, chyba że badanie zostało włączone do innego badania (zob. pkt 3). Należy sporządzić charakterystykę badanych zwierząt pod kątem gatunku, szczepu, źródła pochodzenia, płci, wagi i wieku. Każdemu zwierzęciu należy nadać niepowtarzalny numer identyfikacyjny i oznaczyć je tym numerem. Na tyle, na ile to możliwe, we wszystkich badanych grupach zwierzęta powinny mieć jednakową masę ciała i być w tym samym wieku oraz mieścić się w zakresach typowych dla gatunku lub szczepu objętego badaniem. Do każdej dawki należy wykorzystać młode dojrzałe samice nieródki. Nie należy wykorzystywać rodzeństwa do krycia i należy dołożyć wszelki starań, aby to zapewnić. Dzień 0 danej ciąży jest dniem, w którym odnotowuje się czop pochwowy lub plemniki w pochwie. Po zakupie od dostawcy zapłodnionych w znanym czasie zwierząt należy dać im odpowiedni czas na aklimatyzację (np. 2–3 dni). Pokryte samice należy przydzielić w sposób losowy do grup kontrolnych i grup eksperymentalnych i, o ile to możliwe, rozdzielić je równomiernie między grupy (np. zaleca się procedurę warstwowego doboru losowego w celu zapewnienia równomiernego rozłożenia zwierząt między wszystkie grupy, np. na podstawie masy ciała). Samice inseminowane przez tego samego samca powinny być rozdzielone równomiernie między grupy.

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

11. Każda grupa badana i kontrolna powinna składać się z wystarczającej liczby ciężarnych samic, które mają być poddane działaniu badanej substancji chemicznej, aby uzyskać odpowiednią liczbę potomstwa do oceny neurotoksyczności. W odniesieniu do każdego poziomu dawki zaleca się wykorzystanie łącznie 20 miotów. Dopuszcza się schematy dawkowania powtarzanego i etapowego w odniesieniu do grupy, w przypadkach gdy udaje się uzyskać całkowitą liczbę miotów na grupę i stosuje się odpowiednie modele statystyczne, na podstawie których określa się powtórzenia.

12. W dniu 4. po urodzeniu lub przed nim (dzień porodu jest dniem 0) liczebność każdego miotu powinna zostać dostosowana przez wyeliminowanie dodatkowych młodych w miocie za pomocą doboru losowego, aby uzyskać jednakową liczebność wszystkich miotów (23). Liczebność miotu nie powinna przekraczać średniej liczebności miotu wykorzystanego szczepu gryzoni (8–12). Miot powinien się składać, w miarę możliwości, z takiej samej liczby młodych samców i samic. Selektywna eliminacja młodych, np. oparta na masie ciała, jest nieodpowiednia. Po dokonaniu standaryzacji miotów (eliminacji) i przed dalszymi badaniami funkcjonalnych punktów końcowych należy zidentyfikować w sposób niepowtarzalny poszczególne młode, które wybrano do badań przedodsadzeniowych lub poodsadzeniowych, za pomocą dowolnej odpowiedniej humanitarnej metody przeznaczonej do identyfikacji młodych (np. 24).

Wyznaczanie zwierząt do obserwacji funkcjonalnych i behawioralnych, ocen mas mózgów i ocen neuropatologicznych

13. W opisywanej metodzie badawczej dopuszcza się różne podejścia w odniesieniu do wyznaczania zwierząt, które są poddawane działaniu *in utero* i w okresie laktacji, do obserwacji funkcjonalnych i behawioralnych, oceny dojrzałości płciowej, pomiaru masy mózgu i oceny neuropatologicznej (25). Indywidualnie w odniesieniu do każdego przypadku można dodać inne badania funkcji neurobehawioralnej (np. zachowań społecznych), zmian neurochemicznych lub neuropatologicznych, dopóki nie będzie to zagrażać integralności pierwotnie wymaganych badań.

14. Młode dobiera się z każdej grupy dawkowania i przydziela pod kątem ocen punktów końcowych w dniu 4. po urodzeniu lub później. Dobór młodych należy przeprowadzić w taki sposób, aby, na ile to możliwe, obie płcie z każdego miotu w każdej grupie dawkowania były reprezentowane we wszystkich badaniach w jednakowym stopniu. W celu zbadania aktywności ruchowej należy przeprowadzić badanie na tej samej parze młodych, samca i samicy, na wszystkich etapach wiekowych przed odsadzeniem (zob. pkt 35). Do celów wszystkich innych badań można przydzielić te same lub inne pary samców i samic do różnych badań behawioralnych. Może być wymagane przydzielenie różnych młodych do badań funkcji poznawczych w okresie po odsadzeniu lub w okresie dojrzałości, aby nie dopuścić do pomylenia z wpływem wieku i wcześniejszych szkoleń na te pomiary (26)(27). Przy odsadzaniu (dzień 21. po urodzeniu) można humanitarnie uśmiercić młode, których nie wybrano do badań. Należy odnotować wszelkie zmiany w przydziałach młodych. Statystyczną jednostką miary powinien być miot (lub matka), a nie młode.

15. Istnieją różne sposoby przydzielania młodych do badań przedodsadzeniowych i poodsadzeniowych, badań funkcji poznawczych, badań patologicznych itp. (zob. rys. 1 w odniesieniu do ogólnego schematu i dodatek 1 w odniesieniu do przykładów przydzielania). Zalecana minimalna liczba zwierząt w każdej grupie dawkowania w odniesieniu do badań przedodsadzeniowych i poodsadzeniowych jest następująca:

obserwacje kliniczne i masa ciała	wszystkie zwierzęta
szczegółowe obserwacje kliniczne	20/płeć (1/płeć/miot)
masa mózgu (po utrwalaniu) między dniem 11. a 22. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)
masa mózgu (nieutrwalona) w dniu 70. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)
neuropatologia (zanurzenie lub utrwalenie perfuzyjne) między dniem 11. a 22. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)
neuropatologia (utrwalenie perfuzyjne) w dniu 70. po urodzeniu	10/płeć (1/miot)

dojrzałość płciowa	20/płeć (1/płeć/miot)
inne charakterystyczne punkty rozwojowe (opcjonalne)	wszystkie zwierzęta
rozwój zachowań	20/płeć (1/płeć/miot)
aktywność ruchowa	20/płeć (1/płeć/miot)
funkcje motoryczno-sensoryczne	20/płeć (1/płeć/miot)
uczenie się i pamięć	10/płeć [a] (1/miot)

[a] W zależności od czułości badań funkcji poznawczych należy rozważyć przeprowadzenie badania na dużo większej liczbie zwierząt, np. do 1 samca i 1 samicy na miot (w odniesieniu do przydzielania zwierząt zob. dodatek 1) (dalsze wytyczne dotyczące liczebności próby objęto dokumentem zawierającym wytyczne OECD nr 43 (8)).

Dawkowanie

16. Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek i wprowadzić równoczesną grupę kontrolną. Dawki powinny być zróżnicowane w celu osiągnięcia stopniowania efektów toksycznych. Jeżeli charakter fizykochemiczny lub właściwości biologiczne substancji chemicznej nie powodują ograniczenia dawki, najwyższą dawkę należy dobrać w taki sposób, aby wywołać pewną toksyczność matczyną (np. objawy kliniczne, obniżony przyrost masy ciała (nie więcej niż 10 %) lub oznaki toksyczności ograniczającej wielkość dawki w organie docelowym). Z pewnymi wyjątkami dużą dawkę można ograniczyć do 1 000 mg/kg masy ciała/dzień. Na przykład przewidywane narażenie ludzi może wskazać na potrzebę zastosowania większej dawki. Ewentualnie należy przeprowadzić badania pilotażowe lub badania wstępne mające na celu ustalenie zakresu, aby określić największe dawkowanie, które można zastosować, a które wywoła minimalny stopień toksyczności matczynej. Jeżeli badana substancja chemiczna wykazała toksyczność rozwojową w standardowym badaniu toksyczności rozwojowej lub w badaniu pilotażowym, największa dawka powinna stanowić maksymalną dawkę niewywołującą nadmiernej toksyczności u potomstwa ani zgonu *in utero* lub neonatalnego lub wad rozwojowych, co wystarcza, aby uniemożliwić znaczącą ocenę neurotoksyczności. Najmniejsza dawka nie powinna wywoływać żadnych oznak toksyczności matczynej ani rozwojowej, w tym neurotoksyczności. Należy dobrać malejącą sekwencję dawek w celu wykazania wszystkich zależności dawka-odpowiedź i poziomów dawkowania, przy których nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL), lub dawki bliskie granicy wykrywalności, które pozwolą określić dawkę wyznaczającą. W odniesieniu do ustalenia malejących dawek często jest optymalne wprowadzenie podwójnych do poczwórnych odstępów, a dodanie czwartej grupy dawkowania jest na ogół lepsze niż stosowanie bardzo dużych odstępów (np. współczynnik większy od 10) między dawkowaniami.

17. Dawki należy dobierać, uwzględniając wszystkie istniejące dane dotyczące toksyczności oraz dodatkowe informacje na temat metabolizmu i toksykokinetyki badanej substancji chemicznej lub powiązanych materiałów. Informacje te mogą również pomóc w wykazaniu stosowności schematu dawkowania. Należy rozważyć bezpośrednie podawanie dawki młodym na podstawie informacji dotyczących narażenia i farmakokinetyki (28)(29). Przed przeprowadzeniem badań polegających na bezpośrednim dawkowaniu należy uważnie rozważyć ich zalety i ich wady (30).

18. Równoległa grupa kontrolna powinna stanowić grupę kontrolną poddaną terapii pozorowanej lubgrupę kontrolną nośnika, jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej stosowany jest nośnik. Wszystkim zwierzętom należy zwykle podawać taką samą ilość badanej substancji chemicznej lub nośnika obliczaną na podstawie masy ciała. Jeżeli w celu ułatwienia dawkowania używa się nośnika lub innego dodatku, należy uwzględnić następujące cechy charakterystyczne: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm lub zatrzymywanie badanej substancji chemicznej; wpływ na właściwości chemiczne badanej substancji chemicznej, które mogą zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na przyjmowanie pokarmu lub wody, lub stan odżywienia zwierząt. Nośnik nie powinien wywoływać skutków, które mogłyby przeszkodzić w interpretacji wyników badania, ani nie powinien być toksyczny neurobehawioralnie, ani wpływać na reprodukcję lub rozwój. W przypadku nowatorskich nośników oprócz grupy kontrolnej nośnika należy włączyć grupę kontrolną poddaną terapii pozorowanej. Zwierzęta w grupie kontrolnej (grupach kontrolnych) powinny być traktowane w dokładnie taki sam sposób jak zwierzęta w grupach badanych.

Podawanie dawek

19. Badaną substancję chemiczną lub nośnik należy podawać najbardziej odpowiednią drogą w odniesieniu do potencjalnego narażenia u człowieka i na podstawie dostępnych informacji dotyczących metabolizmu i dystrybucji u badanych zwierząt. Drogą podawania będzie z reguły droga pokarmowa (np. przez sondę, z paszą, z wodą pitną), ale można wykorzystać inne drogi (np. naskórną lub wziewną) w zależności od cech charakterystycznych i przewidywanych lub znanych dróg narażenia u człowieka (dalsze wytyczne można znaleźć w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 43 (8)). Należy uzasadnić wybór drogi podawania. Badaną substancję chemiczną należy podawać każdego dnia mniej więcej o tej samej porze.

20. Dawka podawana każdemu zwierzęciu powinna zwykle zależeć od bieżącej masy ciała danego osobnika. Należy jednak zachować ostrożność przy dostosowywaniu dawek w ostatnim trymestrze ciąży. Jeżeli odnotuje się nadmierną toksyczność u matek objętych podawaniem, należy uśmiercić je w sposób humanitarny.

21. Badaną substancję chemiczną lub nośnik należy podawać pokrytym samicom co najmniej raz dziennie od momentu zagnieżdżenia (6. dzień ciąży) przez cały okres laktacji (dzień 21. po urodzeniu), w związku z czym młode są poddawane narażeniu na badaną substancję chemiczną w okresie neurologicznego rozwoju przedurodzeniowego i pourodzeniowego. Wiek, w którym rozpoczyna się dawkowanie, oraz okres trwania i częstotliwość dawkowania można skorygować, jeżeli istnieją dowody na to, że taki schemat doświadczalny jest bardziej odpowiedni w odniesieniu do narażenia u ludzi. Należy skorygować okresy trwania dawkowania w odniesieniu do innych gatunków, aby zapewnić narażenie w czasie wszystkich wczesnych okresów rozwoju mózgu (tj. równoważnych rozwojowi mózgu człowieka w okresie przed urodzeniem i wczesnym okresie po urodzeniu). Dawkowanie można rozpocząć na początku ciąży (0. dzień ciąży), ale należy uwzględnić możliwość, że badana substancja chemiczna spowoduje utratę zarodka przed zagnieżdżeniem. Rozpoczęcie podawania w 6. dniu ciąży wyeliminowałoby to ryzyko, ale nie pozwoliłoby to zbadać stadiów rozwojowych między 0. a 6. dniem ciąży. W przypadku gdy laboratorium nabywa zwierzęta kryte w znanym czasie, rozpoczęcie dawkowania w 0. dniu ciąży jest niepraktyczne, zatem 6. dzień ciąży byłby dobrym punktem wyjściowym. Laboratorium badawcze powinno określić schemat dawkowania zgodnie z odpowiednimi informacjami dotyczącymi skutków badanej substancji chemicznej, wcześniejszymi doświadczeniami i kwestiami logistycznymi; może on obejmować przedłużenie dawkowania w okresie po odsadzeniu. Dawkowanie nie powinno mieć miejsca w dniu porodu w przypadku tych zwierząt, u których poród był niekompletny. Ogólnie rzecz biorąc, zakłada się, że młode zostaną poddane narażeniu przez mleko matki, należy jednak rozważyć bezpośrednie podawanie dawki młodym w tych przypadkach, w których nie ma dowodów stałego narażenia potomstwa. Dowody stałego narażenia można uzyskać np. z informacji farmakokinetycznych, toksyczności dla potomstwa lub zmian w biomarkerach (28).

OBSERWACJE

Obserwacje matek

22. Co najmniej raz dziennie należy przeprowadzić skrupulatną obserwację wszystkich matek pod kątem warunków dotyczących ich zdrowia, w tym zachorowalności i śmiertelności.

23. W czasie doświadczenia i obserwacji należy okresowo prowadzić bardziej szczegółowe obserwacje kliniczne (przynajmniej dwa razy w okresie dawkowania w czasie ciąży i dwa razy w okresie dawkowania w czasie laktacji), wykorzystując co najmniej dziesięć matek na każdą dawkę. Obserwacje zwierząt na zewnątrz klatki macierzystej powinni przeprowadzić wyszkoleni technicy, którzy nie wiedzą o podawaniu zwierzętom substancji chemicznych, stosując standardowe procedury w celu ograniczenia do minimum stresu u zwierząt i stronniczości obserwatora oraz uzyskania maksymalnej wiarygodności kilku obserwatorów. Zaleca się, aby obserwacje w danym badaniu przeprowadzał ten sam technik, jeżeli istnieje taka możliwość.

24. Należy odnotować występowanie obserwowanych objawów. W przypadkach, w których jest to możliwe, należy również odnotować skalę obserwowanych objawów. Obserwacje kliniczne powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego(np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenicy, zmieniony rytm oddychania lub oddychanie przez jamę ustną i wszelkie nietypowe objawy związane z oddawaniem moczu lub wypróżnianiem).

25. Należy również odnotowywać wszelkie nietypowe reakcje dotyczące pozycji ciała, poziomu aktywności (np. obniżenie lub podwyższenie poziomu eksploracji standardowej powierzchni) i koordynacji ruchowej. Należy także odnotować zmiany w sposobie chodzenia (np. chód kaczkowaty, ataksja), postawie (np. przygarbiony grzbiet) i reaktywności na kontakt, przenoszenie i inne bodźce ze środowiska, jak również obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, konwulsji, drżenia, stereotypii (np. nadmiernego czyszczenia się, nietypowych ruchów głową, powtarzanego kręcenia się), lub dziwnych zachowań (np. gryzienia lub nadmiernego wylizywania, samookaleczania, chodzenia do tyłu, wydawania dźwięków) lub agresji.

26. Należy odnotować wszystkie oznaki toksyczności, w tym dzień ich wystąpienia, porę dnia, stopień i okres trwania.

27. W okresie dawkowania należy ważyć zwierzęta przynajmniej raz na tydzień przez cały okres trwania badania, w dniu porodu lub tuż przed lub po nim i w dniu 21. po urodzeniu (odsadzenie). W przypadku badań z wykorzystaniem sondy należy ważyć matki przynajmniej dwa razy w tygodniu. Dawki powinny być korygowane w momencie określania masy ciała każdego osobnika, stosownie do przypadku. Należy co tydzień mierzyć ilość przyjmowanego pokarmu, co najmniej w okresach ciąży i laktacji. Ilość wypitej wody powinna być mierzona co najmniej raz w tygodniu, jeżeli zwierzę jest poddane narażeniu za pośrednictwem wody pitnej.

Obserwacje potomstwa

28. Co najmniej raz dziennie należy przeprowadzić skrupulatną obserwację całego potomstwa pod kątem oznak toksyczności i zachorowalności oraz śmiertelności.

29. W okresach podawania substancji i obserwacji należy prowadzić bardziej szczegółowe obserwacje kliniczne potomstwa. Obserwacje potomstwa (przynajmniej jednego młodego/płeć/miot) powinni prowadzić wyszkoleni technicy, którzy nie wiedzą o podawaniu zwierzętom substancji, stosując standardowe procedury w celu ograniczenia do minimum stronniczości oraz uzyskania maksymalnej wiarygodności kilku obserwatorów. Zaleca się, aby obserwacje przeprowadzał ten sam technik, jeżeli istnieje taka możliwość. Należy monitorować co najmniej punkty końcowe opisane w pkt 24 i 25 stosownie do obserwowanego stadium rozwojowego.

30. Należy odnotować wszystkie oznaki toksyczności u potomstwa, w tym dzień ich pojawienia się, porę dnia, stopień i okres trwania.

Fizyczne i rozwojowe punkty charakterystyczne

31. Zmiany w charakterystycznych punktach rozwojowych w okresie przed odsadzeniem (np. rozwijanie się małżowiny ucha, otwieranie oczu, wyrzynanie się siekaczy) są ściśle związane z masą ciała (30)(31). Masa ciała może być najlepszym wskaźnikiem rozwoju fizycznego. W związku z tym zaleca się dokonywanie pomiarów charakterystycznych punktów rozwojowych jedynie wówczas, gdy wcześniej pojawiły się oznaki wskazujące, że te punkty końcowe będą stanowić źródło dodatkowych informacji. Częstotliwość przeprowadzania oceny tych parametrów przedstawiono w tabeli 1. W zależności od przewidywanych skutków i wyników pomiarów wstępnych może być zalecane wprowadzenie dodatkowych punktów czasowych lub wykonanie pomiarów na innych stadiach rozwojowych.

32. Do oceny rozwoju fizycznego zaleca się wykorzystywanie zwierząt w okresie po kopulacji, a nie w okresie po urodzeniu (33). Jeżeli przeprowadza się badanie na młodych w dniu odsadzenia, zaleca się, aby badanie to zostało przeprowadzone przed faktycznym odsadzeniem w celu uniknięcia efektu dezorientacji zwierząt spowodowanego stresem towarzyszącym odsadzeniu. Ponadto wszelkie badania na młodych w okresie po odsadzeniu nie powinny być prowadzone przez pierwsze dwa dni po odsadzeniu.

Tabela 1

Częstotliwość przeprowadzania oceny charakterystycznych punktów fizycznych i rozwojowych oraz funkcjonalnych/behawioralnych punktów końcowych [a]

Okres rozwoju / Punkty końcowe	Przed odsadzeniem [b]	Dojrzewanie [b]	Wczesna dorosłość [b]
Charakterystyczne punkty fizyczne i rozwojowe			
Masa ciała i obserwacje kliniczne	co tydzień [c]	co najmniej raz na dwa tygodnie	co najmniej raz na dwa tygodnie
Masa mózgu	dzień 22. po urodzeniu [d]		na koniec badania
Neuropatologia	dzień 22. po urodzeniu [d]		na koniec badania
Dojrzewanie płciowe	—	w stosownych przypadkach	—
Inne charakterystyczne punkty rozwojowe [e]	w stosownych przypadkach	—	—

Punkty końcowe \ Okres rozwoju	Przed odsadzeniem [b]	Dojrzewanie [b]	Wczesna dorosłość [b]
Funkcjonalne/behawioralne punkty końcowe			
Rozwój zachowań	co najmniej dwa pomiary		
Aktywność ruchowa (w tym habituacja)	1–3 razy [f]	—	raz
Funkcje motoryczno-sensoryczne	—	raz	raz
Uczenie się i pamięć	—	raz	raz

[a] W powyższej tabeli przedstawiono minimalną liczbę wykonywania pomiarów. W zależności od przewidywanych skutków i wyników pomiarów wstępnych może być zalecane wprowadzenie dodatkowych punktów czasowych (np. stare zwierzęta) lub wykonanie pomiarów na innych stadiach rozwojowych.
[b] Zaleca się, aby młode nie były poddawane badaniom przez pierwsze dwa dni po odsadzeniu (zob. pkt 32). Zalecanym wiekiem do przeprowadzania badań na zwierzętach w okresie dojrzewania jest: w odniesieniu do uczenia się i pamięci = dzień 25. ± 2 po urodzeniu; w odniesieniu do funkcji motoryczno-sensorycznych = dzień 25. ± 2 po urodzeniu. Zalecanym wiekiem do przeprowadzania badań na młodych dorosłych jest dzień 60–70. po urodzeniu.
[c] W przypadku młodych objętych bezpośrednim dawkowaniem należy co najmniej dwa razy w tygodniu dokonywać pomiarów mas ciała w celu korygowania dawek w czasie gwałtownego przyrostu masy ciała.
[d] W stosownych przypadkach masy mózgu i neuropatologię można ocenić trochę wcześniej (np. w dniu 11 po urodzeniu) (zob. pkt 39).
[e] Oprócz masy ciała należy zarejestrować, w stosownych przypadkach, inne charakterystyczne punkty rozwojowe (np. otwieranie oczu) (zob. pkt 31).
[f] Zob. pkt 35.

33. Należy policzyć żywe młode i określić ich płeć, np. dokonując kontroli wizualnej lub pomiaru odległości anogenitalnej (34)(35), a każde młode z miotu powinno być indywidualnie ważone przy porodzie lub wkrótce po nim, co najmniej raz w tygodniu w okresie laktacji i co najmniej raz na dwa tygodnie po nim. Podczas dokonywania oceny dojrzałości płciowej należy określić wiek i masę ciała zwierzęcia w momencie otwarcia pochwy (36) lub oddzielenia napletka (37) co najmniej w odniesieniu do jednego samca i jednej samicy na miot.

Rozwój zachowań

34. Należy dokonywać pomiarów rozwoju wybranych zachowań u co najmniej jednego młodego/płeć/miot w odpowiednim okresie wiekowym, przy czym to samo młode jest wykorzystywane przez wszystkie dni badania do oceny wszystkich zachowań. Należy zachować jednakowy odstęp dni pomiarów w tym okresie, aby określić normalne lub związane z doświadczeniem zmiany w rozwoju danego zachowania (38). Niektóre przykłady zachowań, w odniesieniu do których można ocenić ich rozwój, są następujące: odruch przyjmowania wyprostowanej postawy, ujemna geotaksja i aktywność ruchowa (38)(39)(40).

Aktywność ruchowa

35. Należy monitorować aktywność ruchową (41)(42)(43)(44)(45) w okresie przed odsadzeniem i w wieku dorosłym. W odniesieniu do badań w czasie odsadzania zob. pkt 32. Sesja badawcza powinna być na tyle długa, aby wykazać w jej trakcie habituację grup kontrolnych nieobjętych narażeniem. Wyraźnie zaleca się wykorzystanie aktywności ruchowej do oceny rozwoju zachowań. Jeżeli wykorzystuje się ją do badania rozwoju zachowań, we wszystkich sesjach badawczych prowadzonych przed odsadzeniem powinno się poddawać ocenie te same zwierzęta. Badanie powinno odbywać się wystarczająco często, aby ocenić rozwój habituacji w trakcie danej sesji (44). W tym celu mogą być wymagane trzy lub więcej okresów czasu, obejmujące okres przed odsadzeniem i dzień odsadzenia (np. dni 13., 17., 21. po urodzeniu). Badanie tych samych zwierząt lub zwierząt z jednego miotu powinno także mieć miejsce w odniesieniu do zwierząt dorosłych tuż przed zakończeniem badania (np. dzień 60–70. po urodzeniu). W razie potrzeby można przeznaczyć dodatkowe dni na badanie. Należy monitorować aktywność ruchową za pomocą zautomatyzowanego sprzętu do rejestrowania aktywności, który powinien być w stanie wykryć zarówno wzrost, jak i obniżenie aktywności (tj. podstawowy poziom aktywności mierzony przez urządzenie nie powinien być tak niski, aby uniemożliwić wykrycie obniżenia aktywności, ani tak wysoki, aby uniemożliwić wykrycie jej wzrostu). Każde urządzenie powinno zostać przetestowane w ramach standardowych procedur, aby zapewnić na ile to tylko możliwe niezawodność działania poszczególnych urządzeń w poszczególnych dniach. Na ile to możliwe eksperymentalne grupy powinny zostać przydzielone równomiernie do poszczególnych urządzeń. Każde zwierzę należy badać indywidualnie. Należy równomiernie dostosować grupy

eksperymentalne do pór dnia badania, aby uniknąć zakłócenia wywołanego dobowym rytmem aktywności biologicznej. Należy dołożyć starań, aby rozbieżności w warunkach badania były minimalne i niepowiązane systematycznie z podawaniem. Do zmiennych, które mogą wpłynąć na wiele składowych pomiaru zachowania, w tym aktywność ruchową, należą poziom dźwięku, rozmiar i kształt klatki do badań, temperatura, wilgotność względna, warunki świetlne, zapachy, stosowanie klatki macierzystej lub nowatorskiej klatki do badań i zakłócenia środowiskowe.

Funkcje motoryczno-sensoryczne

36. Należy szczegółowo zbadać funkcje motoryczno-sensoryczne co najmniej raz w okresie dojrzewania i raz na wczesnym etapie dorosłości (np. dzień 60–70. po urodzeniu). W odniesieniu do badań w czasie odsadzania zob. pkt 32. Należy przeprowadzić ilość testów wystarczającą do zapewnienia odpowiedniego ilościowego próbkowania modalności sensorycznych (np. somatosensorycznych, równowagi) i funkcji motorycznych (np. siła, koordynacja). Niektóre przykłady badań dotyczących funkcji motoryczno-sensorycznych obejmują odruch prostowania się (46), odruch przyjmowania prawidłowej pozycji (47)(48), habituację do nagłych dźwięków (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54) oraz potencjały wywołane (55).

Badania dotyczące uczenia się i pamięci

37. Po odsadzeniu (np. w dniu 25. ± 2 po urodzeniu) i w odniesieniu do młodych dorosłych (dzień 60. po urodzeniu i starsze) należy przeprowadzić badanie asocjacyjnego uczenia się i pamięci. W odniesieniu do badań w czasie odsadzania zob. pkt 32. Na tych dwóch etapach rozwojowych można zastosować to samo badanie lub różne badania. Dopuszcza się pewną elastyczność w wyborze badania (badań) w odniesieniu do uczenia się i pamięci u szczurów odsadzanych i dorosłych. Badania muszą być jednak skonstruowane w taki sposób, aby spełniały dwa kryteria. Po pierwsze, należy oceniać uczenie się jako zmianę w szeregu powtarzanych prób lub sesji uczenia się lub, w badaniach składających się z pojedynczej próby, w odniesieniu do warunku kontrolującego nieasocjacyjne skutki przyzwyczajenia. Po drugie, oprócz podstawowego uczenia się (przyswajania) badania powinny obejmować niektóre pomiary pamięci (krótkotrwałej lub długotrwałej), ale nie można odnotować tego pomiaru pamięci, jeżeli brak jest pomiaru przyswajania uzyskanego w tym samym badaniu. Jeżeli badania uczenia się i pamięci wykażą wpływ badanej substancji chemicznej, można rozważyć przeprowadzenie dodatkowych badań w celu wykluczenia alternatywnych interpretacji na podstawie zmian w zdolnościach sensorycznych, motywacyjnych lub motorycznych. Poza powyższymi dwoma kryteriami zaleca się, aby wybór badania dotyczącego uczenia się i pamięci był oparty na wykazanej w badaniu czułości na klasę badanej substancji chemicznej, jeżeli informację dotyczącą tej wrażliwości można znaleźć w literaturze. W przypadku braku takiej informacji przykłady badań, które mogłyby zostać przeprowadzone, aby spełnić powyższe kryteria, obejmują: unikanie bierne (43)(56)(57), opóźnienie w orientacji przestrzennej w przypadku dorosłych szczurów (58) i szczurów tuż po urodzeniu (59), warunkowanie węchowe (43)(60), labirynt wodny Morrisa (61)(62)(63), labirynt Biela lub labirynt typu Cincinnati (64)(65), koncentrycznie ramienny labirynt (66), labirynt typu T (43) oraz nabycie i utrzymanie zachowań kontrolowanych zgodnie z planem (26)(67)(68). Dodatkowe badania opisano w literaturze dotyczącej szczurów odsadzonych (26)(27) i dorosłych szczurów (19)(20).

Sekcja zwłok

38. Po odsadzeniu potomstwa matki można poddać eutanazji.

39. Ocena neuropatologiczna potomstwa zostanie przeprowadzona przy użyciu tkanek zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny w dniu 22. po urodzeniu lub we wcześniejszym punkcie czasowym między dniem 11. a 22. po urodzeniu oraz na koniec badania. W przypadku potomstwa uśmierconego w dniu 22. po urodzeniu należy ocenić tkanki mózgu, a w przypadku zwierząt uśmierconych na koniec badania należy ocenić zarówno tkanki ośrodkowego układu nerwowego, jak i tkanki obwodowego układu nerwowego. Zwierzęta uśmiercone w dniu 22. po urodzeniu lub wcześniej mogą zostać utrwalone za pomocą zanurzenia lub perfuzji. Zwierzęta uśmiercone na koniec badania należy utrwalić za pomocą perfuzji. Na wszystkich etapach preparowania próbek tkanek, począwszy od procesu perfuzji zwierząt przez wycinanie próbek tkanki, przetwarzanie tkanki i barwienie preparatów, należy stosować zrównoważony schemat, tak aby każda seria zawierała reprezentatywne próbki z każdej grupy dawkowania. Dodatkowe wytyczne dotyczące neuropatologii można znaleźć w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 20 (9), zob. również (103).

Przetwarzanie próbek tkanki

40. Należy odnotować wszystkie poważne anomalie dostrzegalne podczas autopsji. Pobrane próbki tkanek powinny reprezentować wszystkie główne obszary układu nerwowego. Próbki tkanek należy przechowywać w odpowiednim utrwalaczu i przetwarzać zgodnie z opublikowanymi znormalizowanymi protokołami histologicznymi (69)(70)(71)(103). Dopuszczalne jest zanurzenie tkanek ośrodkowego układu nerwowego i obwodowego układu nerwowego w parafinie, ale stosowanie osmu po utrwaleniu wstępnym wraz z zanurzeniem w żywicach epoksydowych może być odpowiednie, gdy wymagany jest wyższy stopień rozdzielczości (np. w przypadku nerwów obwodowych, gdy podejrzewa się neuropatię obwodową, lub w przypadku analizy morfometrycznej nerwów

obwodowych). Tkankę mózgową zgromadzoną do celów analizy morfometrycznej należy zanurzyć w odpowiednich roztworach w odniesieniu do wszystkich dawek w tym samym czasie, aby uniknąć pojawienia się artefaktów będących efektem kurczenia się pobranego materiału, co może być związane z przedłużonym przechowywaniem w utrwalaczu (6).

Badanie neuropatologiczne

41. Cele obserwacji jakościowej są następujące:

(i) identyfikacja obszarów w układzie nerwowym wykazujących dowody zmian neuropatologicznych;

(ii) identyfikacja rodzajów zmian neuropatologicznych wynikających z narażenia na działanie badanej substancji chemicznej; oraz

(iii) określenie zakresu dotkliwości zmian neuropatologicznych.

Odpowiednio wyszkolony patolog powinien zbadać mikroskopowo reprezentatywne wycinki histologiczne próbek tkanek pod kątem wystąpienia zmian neuropatologicznych. Wszystkim zmianom neuropatologicznym należy przypisać subiektywny stopień wskazujący dotkliwość. Barwniki hemotaksylina i eozyna mogą być wystarczające do przeprowadzenia oceny wycinków mózgu zwierząt uśmierconych w sposób humanitarny w dniu 22. po urodzeniu lub wcześniej. W odniesieniu do wycinków tkanek ośrodkowego układu nerwowego i obwodowego układu nerwowego pochodzących od zwierząt uśmierconych na koniec badania zaleca się jednak barwnik mieliny (np. luxol fast blue/fiolet krezylowy) i barwnik srebrny (do barwienia metodą Bielschowsky'ego lub Bodiana (srebrzenie)). Z zastrzeżeniem profesjonalnego osądu patologa i rodzaju zaobserwowanych zmian można uznać adekwatność innych barwników do identyfikowania i scharakteryzowania szczególnych rodzajów zmian (np. kwaśne białko włókienkowe (GFAP) lub histochemia lektyn do oceny zmian komórek glejowych lub mikroglejowych (72), fluorochrom Fluor-Jade do wykrywania martwicy (73)(74), lub barwniki srebrne, w szczególności w odniesieniu do chorób neurodegeneracyjnych (75)).

42. Należy przeprowadzić ocenę morfometryczną (ilościową), ponieważ uzyskane z niej dane mogą pomóc w wykrywaniu skutków związanych z podawaniem i są cenne w interpretowaniu związanych z podawaniem różnic w masie mózgu lub morfologii (76)(77). Należy pobrać próbki tkanki nerwowej i spreparować je w celu umożliwienia przeprowadzenia oceny morfometrycznej. Ocena morfometryczna może obejmować np. pomiary liniowe lub powierzchniowe określonych obszarów mózgu (78). Pomiary liniowe lub powierzchniowe wymagają zastosowania homologicznych wycinków, które starannie wybrano na podstawie wiarygodnych, mikroskopowych punktów charakterystycznych (6). Można zastosować stereologię w celu zidentyfikowania związanego z podawaniem wpływu na parametry takie jak objętość lub liczba komórek w odniesieniu do określonych obszarów neuroanatomicznych (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Należy zbadać mózgi pod kątem wszelkich dowodów zmian neuropatologicznych związanych z podawaniem i pobrać odpowiednie próbki ze wszystkich głównych obszarów mózgu (np. opuszków węchowych, kory mózgu, hipokampu, jądra podstawnego, wzgórza, podwzgórza, śródmózgowia (pokrywy śródmózgowia, nakrywki śródmózgowia i konarów mózgu), mostu, rdzenia przedłużonego, móżdżka), aby zapewnić dokładność badania. Ważne jest, aby wycinki od wszystkich zwierząt zostały pobrane w tej samej płaszczyźnie. W odniesieniu do zwierząt dorosłych uśmierconych w sposób humanitarny na koniec badania należy pobrać próbki reprezentatywnych wycinków rdzenia kręgowego i obwodowego układu nerwowego. Obszary badane powinny obejmować oko z nerwem wzrokowym i siatkówką, rdzeń kręgowy na poziomie opuchniętych kręgów szyjnych i lędźwiowych, włókno korzeni grzbietowych i brzusznych, proksymalny odcinek nerwu kulszowego, proksymalny odcinek nerwu piszczelowego (przy kolanie) i gałęzie mięśniowe nerwu piszczelowego. Skrawki rdzenia kręgowego i nerwów obwodowych powinny obejmować przekroje poprzeczne i podłużne.

44. Oprócz zmian komórkowych (np. wakuolizacji neuronów, degeneracji, martwicy) i zmian tkanek (np. glejozy, nacieku leukocytów, torbieli) ocena neuropatologiczna powinna obejmować badanie pod kątem wskaźników zaburzeń rozwojowych w układzie nerwowym (6)(85)(86)(87)(88)(89). W tym względzie ważne jest odróżnienie skutków związanych z podawaniem od zwykłych zjawisk związanych z rozwojem, o których wiadomo, że wystąpią w stadium rozwojowym odpowiadającym czasowi uśmiercenia (90). Przykłady znacznych zmian, które wskazują na nieprawidłowy rozwój, obejmują między innymi:

— zmiany wielkości lub kształtu opuszek węchowych, mózgu lub móżdżka,

— zmiany względnej wielkości różnych obszarów mózgu, w tym zmniejszenia lub powiększenia wielkości obszarów wynikające ze straty lub utrzymywania się zwykle przejściowych populacji komórek bądź rzutów neuronów (np. zewnętrzne listki zarodkowe móżdżka, ciało modzelowate),

— zmiany w proliferacji, migracji i różnicowaniu, na które wskazują obszary nadmiernej apoptozy lub martwicy, skupiska lub rozproszone populacje ektopowych, zdezorientowanych lub zdeformowanych neuronów lub zmian we względnej wielkości różnych warstw struktur korowych,

— zmiany w strukturach mielinacji, w tym ogólna redukcja wielkości lub zmienione barwienie struktur mielinowych,

— oznaki wodogłowia, w szczególności powiększenie komór, zwężenie wodociągu mózgu i coraz cieńsze półkule mózgu.

Analiza zależności dawka-odpowiedź w zmianach neuropatologicznych

45. Do celów przeprowadzenia neuropatologicznej analizy jakościowej i ilościowej zaleca się stosowanie następujących procedur sekwencyjnych. Po pierwsze, wycinki z grupy otrzymującej wysoką dawkę porównuje się z wycinkami pozyskanymi z grupy kontrolnej. Jeżeli u zwierzęcia z grupy otrzymującej wysoką dawkę nie wykryto żadnych zmian neuropatologicznych, dalsze analizy nie są wymagane. Jeżeli w grupie otrzymującej wysoką dawkę występują zmiany neuropatologiczne, poddaje się badaniom zwierzęta z grupy otrzymującej średnią dawkę i z grupy otrzymującej niską dawkę. W przypadku gdy grupa otrzymująca wysoką dawkę zostaje wyeliminowana ze względu na śmierć lub inną zakłócającą toksyczność, należy zbadać grupy otrzymujące średnią i niską dawkę pod kątem zmian neuropatologicznych. W przypadku wystąpienia jakiejkolwiek oznaki neurotoksyczności w grupach otrzymujących niższe dawki należy przeprowadzić w tych grupach badanie neuropatologiczne. Jeżeli podczas badania jakościowego lub ilościowego wykryto jakiekolwiek zmiany neuropatologiczne związane z podawaniem, należy określić zależność tej zmiany od dawki oraz częstotliwość i stopień dotkliwości zmian patologicznych lub zmian morfometrycznych na podstawie oceny wszystkich zwierząt ze wszystkich grup dawkowania. Należy objąć tą oceną wszystkie obszary mózgu, w których występują jakiekolwiek oznaki zmian neuropatologicznych. W odniesieniu do każdego rodzaju zmiany patologicznej należy opisać cechy charakterystyczne stosowane przy określaniu każdego stopnia dotkliwości, wskazując na te cechy, które różnicują poszczególne stopnie. Należy odnotować częstotliwość występowania każdego rodzaju zmiany i stopień jej dotkliwości oraz przeprowadzić analizę statystyczną w celu dokonania oceny charakteru zależności dawka-odpowiedź. Zaleca się stosowanie zakodowanych szkiełek laboratoryjnych (91).

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

46. Dane należy odnotowywać oddzielnie w formie zestawień tabelarycznych przedstawiających w odniesieniu do każdej grupy badanej rodzaj zmiany i liczbę matek, liczbę potomstwa w podziale na płeć i liczbę miotów, u których wystąpił każdy rodzaj zmiany. Jeżeli przeprowadzono bezpośrednie narażenie potomstwa po urodzeniu, należy odnotować drogę, czas trwania i okres narażenia.

Ocena i interpretacja wyników

47. Badanie neurotoksyczności rozwojowej dostarczy informacji na temat wpływu powtarzanego narażenia na substancję chemiczną podczas rozwoju *in utero* i wczesnego rozwoju po urodzeniu. Ponieważ szczególną uwagę przywiązuje się do punktów końcowych toksyczności ogólnej i neurotoksyczności rozwojowej, wyniki badania pozwolą na odróżnienie skutków neurorozwojowych występujących przy braku ogólnej toksyczności matczynej od występujących jedynie na poziomach, które są toksyczne również dla matki. Ze względu na złożone wzajemne powiązania między projektem badania, analizą statystyczną i biologicznym znaczeniem danych odpowiednia interpretacja danych dotyczących neurotoksyczności rozwojowej będzie wymagała profesjonalnego osądu (107) (109). Przy interpretowaniu wyników badania należy stosować podejście wagi dowodów (20)(92)(93)(94). Należy omówić wzory wyników badań behawioralnych lub morfologicznych, jeżeli występują, oraz dowody zależności dawka-odpowiedź. W tej charakterystyce należy zawrzeć dane pochodzące ze wszystkich badań powiązanych z oceną neurotoksyczności rozwojowej, w tym badań epidemiologicznych lub studiów przypadków u ludzi, i badań na zwierzętach doświadczalnych (np. dane toksykokinetyczne, informacje dotyczące związku między strukturą a działaniem, dane z innych badań toksyczności). Obejmują one związek między dawkami badanej substancji chemicznej a obecnością lub brakiem, częstotliwością występowania i zakresem każdego skutku neurotoksycznego w odniesieniu do każdej płci (20)(95).

48. Ocena danych powinna obejmować omówienie istotności biologicznej i statystycznej. Należy postrzegać analizę statystyczną raczej jako narzędzie, które nie determinuje interpretacji danych, a tylko wskazuje sposób. Brak istotności statystycznej nie powinien stanowić jedynego uzasadnienia dla stwierdzenia braku skutków związanych z podaniem, tak jak istotność statystyczna nie powinna stanowić jedynego uzasadnienia dla stwierdzenia skutków związanych z podaniem. Aby chronić przed ewentualnie fałszywie ujemnymi wynikami i trudnościami wiążącymi się nieodłącznie z »przeprowadzaniem dowodu negatywnego«, należy omówić dostępne dane dotyczące dodatniej i historycznej kontroli, zwłaszcza jeżeli nie występują skutki związane z podaniem (102)(106). Należy omówić prawdopodobieństwo fałszywie dodatnich wyników w kontekście całkowitej oceny statystycznej danych (96). Ocena powinna obejmować związek, jeżeli taki występuje, między obserwowanymi zmianami neuropatologicznymi i behawioralnymi.

49. Należy przeanalizować wszystkie wyniki, stosując modele statystyczne odpowiednie do schematu doświadczalnego (108). Należy uzasadnić wybór analizy parametrycznej lub nieparametrycznej, uwzględniając czynniki takie jak charakter danych (przetworzone lub nieprzetworzone) i ich rozkład oraz względną odporność wybranej analizy statystycznej. Wybór analizy statystycznej powinien być podyktowany celem i projektem badania, aby ograniczyć do minimum błędy typu I (fałszywie dodatnie) i typu II (fałszywie ujemne) (96)(97)(104)(105). W badaniach rozwojowych, w których wykorzystuje się gatunki wielorodne i w których badaniom poddana jest większa liczba młodych z danego miotu, należy uwzględnić miot w modelu statystycznym, aby uniknąć zbyt wielu błędów typu I (98)(99)(100)(101). Statystyczną jednostką miary powinien być miot, a nie młode. Doświadczenia powinny być zaprojektowane w taki sposób, aby zwierzęta z jednego miotu nie były traktowane jak oddzielne obiekty obserwacji. Należy kilkakrotnie przeprowadzić analizę każdego punktu końcowego mierzonego w tym samym podmiocie, stosując modele statystyczne, które wyjaśniają zależność tych pomiarów.

Sprawozdanie z badania

50. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— charakter fizyczny i, w stosownych przypadkach, właściwości fizykochemiczne,

— dane identyfikacyjne, w tym źródło,

— czystość preparatu i znane lub przewidywane zanieczyszczenia.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeżeli jest inny niż woda lub roztwór soli fizjologicznej.

Badane zwierzęta:

— wykorzystany gatunek i szczep oraz uzasadnienie, jeżeli wykorzystano inne zwierzęta niż szczury,

— dostawca badanych zwierząt,

— liczba zwierząt, ich wiek na początku badań i ich płeć,

— źródło pochodzenia, warunki trzymania, pasza, woda itp.,

— masa ciała każdego zwierzęcia na początku badania.

Warunki badania:

— uzasadnienie w odniesieniu do wyboru poziomu dawki,

— uzasadnienie w odniesieniu do drogi dawkowania i okresu dawkowania,

— specyfikacje w zakresie podawanych dawek, w tym szczegóły dotyczące nośnika, objętości i formy fizycznej podawanego materiału,

— szczegóły dotyczące przygotowania formy użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowania paszy, uzyskanego stężenia, trwałości i jednorodności preparatu,

— metoda stosowana do niepowtarzalnej identyfikacji matek i potomstwa,

— szczegółowy opis procedur(-y) randomizacji stosowanych(-ej) do przydzielania matek do grup badanych, doboru młodych do eliminacji i przydzielania młodych do grup eksperymentalnych,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— w stosownych przypadkach przeliczenie stężeń (ppm) badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie pitnej lub roztworze do inhalacji na dawkę faktyczną (mg/kg masy ciała/dzień),

— warunki środowiskowe,

— szczegóły dotyczące jakości pokarmu i wody (np. kranowa, destylowana),

— daty rozpoczęcia i zakończenia badania.

Obserwacje i procedury badawcze:

— szczegółowy opis procedur stosowanych do standaryzacji obserwacji i procedur oraz definicji operacyjnych do celów punktowego oceniania obserwacji,

— wykaz wszystkich procedur badawczych i uzasadnienie ich zastosowania,

— szczegóły dotyczące zastosowanych procedur badań behawioralnych/funkcjonalnych, patologicznych, neurochemicznych lub elektrofizjologicznych, w tym informacje i szczegóły dotyczące urządzeń automatycznych,

— procedury kalibracji i zapewniania równoważności urządzeń oraz bilansowanie grup eksperymentalnych w procedurach badawczych,

— krótkie uzasadnienie wyjaśniające wszelkie decyzje wiążące się z profesjonalnym osądem.

Wyniki (indywidualne i zbiorcze, w tym średnia i wariancja w stosownych przypadkach):

— liczba zwierząt na początku badania i liczba zwierząt na końcu badania,

— liczba zwierząt i miotów wykorzystanych do każdej metody badawczej,

— numer identyfikacyjny każdego zwierzęcia i miot, z którego pochodzi,

— liczebność miotu i jego średnia ważona przy urodzeniu w podziale na płeć,

— masa ciała i dane dotyczące zmiany masy ciała, w tym masa ciała matek i potomstwa na koniec badań,

— dane dotyczące spożycia pokarmu oraz, w razie potrzeby, wypitej wody (np. jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana z wodą),

— dane dotyczące reakcji toksycznej według płci i dawki, w tym objawy toksyczności lub śmiertelność, w stosownych przypadkach z podaniem czasu i przyczyny śmierci,

— charakter szczegółowych obserwacji klinicznych, ich dotkliwość, czas trwania, dzień rozpoczęcia, pora dnia i ich późniejszy przebieg,

— wynik punktowy w odniesieniu do każdego charakterystycznego punktu rozwojowego (masy ciała, dojrzałości płciowej i rozwoju zachowań) z każdego okresu obserwacji,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań behawioralnych, funkcjonalnych, neuropatologicznych, neurochemicznych, elektrofizjologicznych według płci, w tym wzrosty i spadki w porównaniu do grupy kontrolnej,

— wyniki sekcji zwłok,

— masy mózgów,

— wszelkie diagnozy postawione na podstawie objawów neurologicznych i zmian patologicznych, w tym pojawiające się w sposób naturalny choroby lub warunki,

— obrazy przykładowych wyników badań,

— obrazy z urządzeń o małej mocy do oceny homologii wycinków zastosowanych do celów morfometrii,

— dane dotyczące wchłaniania i metabolizmu, w tym dane uzupełniające z odrębnych badań toksykokinetycznych, jeżeli są dostępne,

— statystyczne opracowanie wyników, w tym modele statystyczne zastosowane w celu analizy danych, i wyniki, niezależnie od tego, czy były istotne,

— wykaz personelu badawczego, w tym odbyte szkolenia zawodowe.

Omówienie wyników:

— informacje dotyczące zależności dawka-odpowiedź według płci i grupy,

— związek wszelkich innych skutków toksycznych z wnioskiem dotyczącym neurotoksycznego potencjału badanej substancji chemicznej według płci i grupy,

— wpływ wszelkich informacji toksykokinetycznych na wnioski,

— podobieństwa skutków do jakichkolwiek znanych środków neurotoksycznych,

— dane potwierdzające wiarygodność i czułość metody badawczej (np. dodatnie i historyczne dane kontrolne),

— związki, jeżeli występują, między skutkami neuropatologicznymi a czynnościowymi,

— NOAEL lub dawka wyznaczająca w odniesieniu do matek i potomstwa według płci i grupy.

Wnioski:

— omówienie ogólnej interpretacji danych na podstawie wyników, w tym wniosek dotyczący tego, czy badana substancja chemiczna spowodowała neurotoksyczność rozwojową, i NOAEL.

LITERATURA

(1) OECD (1995), Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity, Kopenhaga, Dania, 13–14 czerwca 1995 r.

(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, Dostępne na stronie: [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. Dostępne na stronie: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss B., Mileson B. (2001), »Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects«, *Environ. Health Perspect*. 109, s. 79–91.

(5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher J.E. Jr., Fisher J.W., Harry G.J., Li A.A., Makris S.L., Padilla S., Sultatos L.G., Mileson B.E. (2001), »Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations«, *Environ. Health Perspect*. 109, s. 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, s. 93–100.

(7) OECD (2003), Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing, Waszyngton D.C., US, 23–25 października 2000 r.

(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, Paryż, lipiec 2008 r. Dostępne na stronie: [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, Paryż, wrzesień 2003 r. Dostępne na stronie: [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, s. 173–292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000), *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, Nowy Jork.

(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, s. 188–197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998), *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, Nowy Jork.

(14) Rozdział B.34 niniejszego załącznika: »Badanie toksyczności reprodukcji jednego pokolenia«.

(15) Rozdział B.35 niniejszego załącznika: »Dwupokoleniowe badanie toksyczności reprodukcyjnej«.

(16) Rozdział B.43 niniejszego załącznika: »Badanie neurotoksyczności u gryzoni«.

(17) Rozdział B.31 niniejszego załącznika: »Badanie przedurodzeniowej toksyczności rozwojowej«.

(18) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33.

(19) WHO (1986), *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals* (Environmental Health Criteria 60), Albany, Nowy Jork: World Health Organization Publications Center, USA. Dostępne na stronie: [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, Genewa. Dostępne na stronie: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995), Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition, ISBN 012168055X, Academic Press, Nowy Jork.

(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, s. 499–509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997), »The rationale for culling of rodent litters«, *Fundam. Appl. Toxicol.* 38, s. 2–6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977), »Foot tattoo of neonatal mice«, *Lab. Animal Sci.* 27, s. 110–112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989), »Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity«, *Fundam. Appl. Toxicol.* 13, s. 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, Waszyngton, 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, s. 87–94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999), »Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment«, *Toxicol. Sci.* 49, s. 1–4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: »Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A)«. Międzynarodowa konferencja ds. harmonizacji wymagań technicznych dla rejestracji produktów leczniczych stosowanych u ludzi.

(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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 298–303.

(38) Spear, L.P. (1990), »Neurobehavioral assessment during the early postnatal period«, *Neurotoxicol. Teratol.* 12, s. 489–95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975), »Postnatal development of locomotion in the laboratory rat«, *Anim. Behav.* 23, s. 896–920.

(40) Adams, J. (1986), »Methods in Behavioral Teratology«, [w:] *Handbook of Behavioral Teratology*, Riley, E.P., Vorhees, C. V. (red.) Plenum Press, Nowy Jork, s. 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, s. 53–66.

(42) Robbins, T.W. (1977), »A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity«, [w:] *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (red.) Plenum Press, Nowy Jork, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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 r., s. 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, s. 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, s. 589–591.

(49) Davis, M. (1984), »The mammalian startle response«, [w:] *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (red.), Plenum Press, Nowy Jork, s. 287–351.

(50) Koch, M. (1999), »The neurobiology of startle«, *Prog. Neurobiol.* 59, s. 107–128.

(51) Crofton, K.M. (1992), »Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction«, [w:] *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (red.). Raven Press, Nowy Jork, s. 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, s. 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, s. 25–30.

(54) Ison, J.R. (1984), »Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure«, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 6, s. 437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992), »Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes«, [w:] *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (red.), Raven Press, Nowy Jork. s. 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, s. 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, s. 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, s. 237–244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989), »Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat«, *Behav. Neurosci.* 103, s. 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, s. 465–479.

(61) Morris, R. (1984), »Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat«, *J. Neurosci. Methods* 11, s. 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, s. 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, s. 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, s. 235–241.

(65) Vorhees, C.V. (1997), »Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins«, *Drug Chem. Toxicol.* 20, s. 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, s. 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, s. 342–352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981), »Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding«, *J. Gerontol.* 36, s. 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, s. 122–131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994), *Laboratory Methods in Histotechnology,* American Registry of Pathology, Waszyngton, DC, s. 84–107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002), *Theory and Practice of Histological Techniques,* 5th edition, Churchill Livingstone, Londyn.

(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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998), *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, Nowy Jork.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998), »Stereology: A practical primer for neuropathology«, J. *Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, s. 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, s. 262–268.

(82) Schmitz, C. (1997), »Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology«, *J. Neurocytol.* 26, s. 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, s. 51–61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005), »Design-based stereology in neuroscience«, *Neuroscience* 130, s. 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, s. 113–121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995), »Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum«, *Develop. Brain Res.* 84, s. 294–298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998), »Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology«, [w:] *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (red.), Academic Press, Nowy Jork, s. 3–41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999), »Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain«, *Science* 283, s. 70–74.

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000), »Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome«, *Science* 287, s. 1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989), *Developmental Neuropathology*, wydanie drugie, 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, s. 127–133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996), »Setting exposure standards: a decision process«, *Environ. Health Perspect.* 104, s. 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) Duńska Agencja Ochrony Środowiska (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, s. 113–126.

(97) Gad, S.C. (1989), »Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology«, *J. Am. Coll. Toxicol.* 8, s. 21–27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973), »Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring«, *Dev. Psychobiol.* 6, s. 329–335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975), »Selection of the experimental unit in teratology studies«, *Teratology* 12, s. 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, s. 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, s. 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, s. 345–352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., oraz grupa robocza *ad hoc* STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006), »A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today«, *Toxicol. Pathol.* 34, s. 296–313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992), »The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies«, *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3), s. 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, s. 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), s. 266–287.

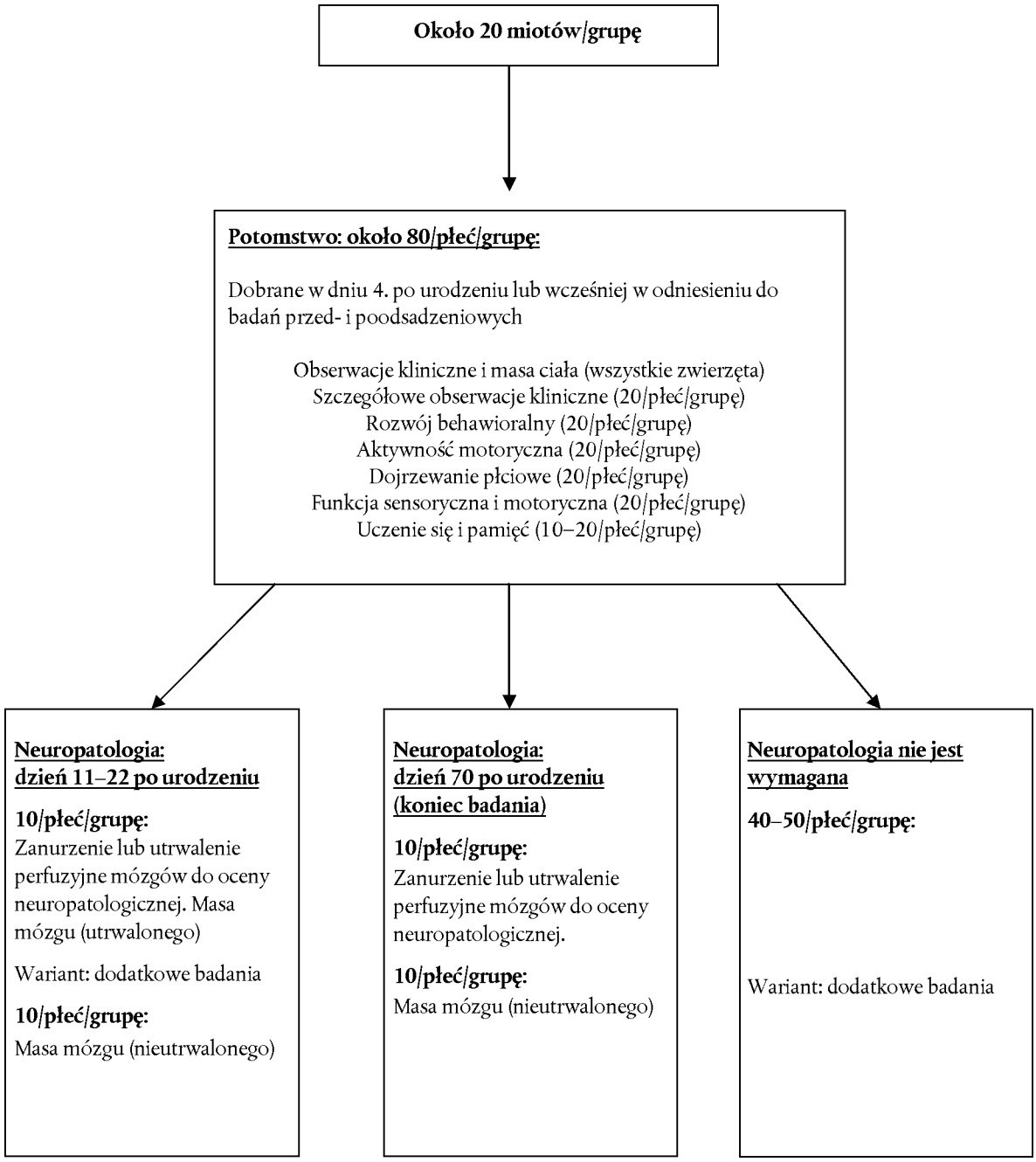
(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008), »Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints«, *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4), s. 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), s. 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), s. 349–381.

Rysunek 1

Ogólny schemat badań w odniesieniu do badań behawioralnych/funkcjonalnych, oceny neuropatologicznej i mas mózgów. Poniższy diagram jest oparty na opisach z pkt 13–15. Przykłady przydzielania zwierząt znajdują się w dodatku 1.



Dodatek 1

1. Poniżej opisano i przedstawiono w formie tabeli przykłady ewentualnych przydziałów. Przykłady te mają na celu ukazać, że przydział zwierząt objętych badaniem do różnych modeli badania może przebiegać na wiele sposobów.

Przykład 1

2. Do badania rozwoju zachowań w okresie przedodsadzeniowym wykorzystuje się grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych zwierząt 10 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) jest uśmiercanych w sposób humanitarny w dniu 22 po urodzeniu. Ich mózgi są usuwane, ważone i przetwarzane do oceny histopatologicznej. Poza tym gromadzi się dane dotyczące masy mózgu, stosując nieutrwalone mózgi pozostałych 10 samców i 10 samic na dawkę.

3. Kolejną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot) wykorzystuje się do badań funkcjonalnych/behawioralnych w okresie poodsadzeniowym (szczegółowych obserwacji klinicznych, aktywności ruchowej, reakcji na nagły dźwięk i badania funkcji poznawczej u zwierząt w okresie dojrzewania) i oceny wieku dojrzewania płciowego. Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje znieczulonych i utrwalonych przez perfuzję na koniec badania (około dnia 70 po urodzeniu). Po dodatkowym utrwaleniu *in situ* usuwa się mózg i przetwarza się go w celu oceny neuropatologicznej.

4. W badaniu funkcji poznawczej u młodych dorosłych (np. dzień 60–70 po urodzeniu) wykorzystuje się trzecią grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje uśmierconych na koniec badania, a ich mózgi są usuwane i ważone.

5. Pozostałe 20 zwierząt/płeć/grupę zachowuje się do możliwych dodatkowych badań.

Tabela 1

Nr młodego [a]		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Rozwój zachowań
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria w dniu 22 po urodzeniu
		10 m + 10 f	Masa mózgu w dniu 22 po urodzeniu
2	6	20 m + 20 f	Szczegółowe obserwacje kliniczne
		20 m + 20 f	Aktywność ruchowa
		20 m + 20 f	Dojrzałość płciowa
		20 m + 20 f	Funkcje motoryczno-sensoryczne
		20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (dzień 25 po urodzeniu)
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu
3	7	20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (młode dorosłe)
		10 m + 10 f	Masa mózgu młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu
4	8	—	Zatrzymanie zwierząt w celu wymiany lub w celu dodatkowych badań

[a] W tym przykładzie mioty zostały ograniczone do 4 samców (m) + 4 samic (f); młode samce oznaczono numerami od 1 do 4, a młode samice od 5 do 8.

Przykład 2

6. Do badania rozwoju zachowań w okresie przedodsadzeniowym wykorzystuje się grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych zwierząt 10 młodych/płeć/dawkę (1 samiec lub 1 samica na miot) jest uśmiercanych w sposób humanitarny w dniu 11 po urodzeniu. Ich mózgi są usuwane, ważone i przetwarzane do oceny histopatologicznej.

7. Inną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (1 samiec i 1 samica na miot) wykorzystuje się do badań po odsadzeniu (szczegółowych obserwacji klinicznych, aktywności ruchowej, oceny wieku dojrzewania płciowego oraz funkcji motoryczno-sensorycznych). Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje znieczulonych i utrwalonych przez perfuzję na koniec badania (około dnia 70 po urodzeniu). Po dodatkowym utrwaleniu *in situ* usuwa się mózg, waży się go i przetwarza w celu oceny neuropatologicznej.

8. W badaniu funkcji poznawczej u osobników dojrzewających i młodych dorosłych wykorzystuje się 10 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca lub 1 samicę na miot). Do celów badań funkcji poznawczej w dniu 23 po urodzeniu i u młodych dorosłych wykorzystuje się inne zwierzęta. Na koniec badania 10 zwierząt/płeć/grupę objętych badaniem jako dorosłe zostaje uśmierconych, a ich mózgi są usuwane i ważone.

9. Pozostałe 20 zwierząt/płeć/grupę niewybranych do badań uśmierca się i utylizuje przy odsadzaniu.

Tabela 2

Nr młodego [a]		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
1	5	20 m + 20 f	Rozwój zachowań
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria w dniu 11 po urodzeniu
2	6	20 m + 20 f	Szczegółowe obserwacje kliniczne
		20 m + 20 f	Aktywność ruchowa
		20 m + 20 f	Dojrzałość płciowa
		20 m + 20 f	Funkcje motoryczno-sensoryczne
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu
3	7	10 m + 10 f [b]	Uczenie się i pamięć (dzień 23 po urodzeniu)
3	7	10 m + 10 f [b]	Uczenie się i pamięć (młode dorosłe)
			Masa mózgu młodego dorosłego
4	8	—	Zwierzęta uśmiercone i zutylizowane w dniu 21 po urodzeniu

[a] W tym przykładzie mioty zostały ograniczone do 4 samców (m) + 4 samic (f); młode samce oznaczono numerami od 1 do 4, a młode samice od 5 do 8.

[b] Do celów badań funkcji poznawczej w dniu 23 po urodzeniu i u młodych dorosłych wykorzystuje się różne młode (np. parzyste/nieparzyste mioty z całkowitej liczby 20 miotów).

Przykład 3

10. Do celów pomiaru masy mózgu i oceny neuropatologicznej w dniu 11 po urodzeniu wykorzystuje się grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród tych zwierząt 10 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje uśmierconych w sposób humanitarny w dniu 11 po urodzeniu, a ich mózgi są usuwane, ważone i przetwarzane do oceny histopatologicznej. Poza tym gromadzi się dane dotyczące masy mózgu, stosując nieutrwalone mózgi pozostałych 10 samców i 10 samic na dawkę.

11. Kolejną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot) wykorzystuje się do celów badania rozwoju zachowań (aktywności ruchowej), badań w okresie po odsadzeniu (aktywności ruchowej i oceny wieku dojrzewania płciowego) i badania funkcji poznawczej u osobników dojrzewających.

12. Następną grupę 20 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot) wykorzystuje się do celów badania funkcji motoryczno-sensorycznych (reakcja na nagły dźwięk) i szczegółowych obserwacji klinicznych. Spośród tych osobników 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje znieczulonych i utrwalonych przez perfuzję na koniec badania (około dnia 70 po urodzeniu). Po dodatkowym utrwaleniu *in situ* usuwa się mózg, waży się go i przetwarza w celu oceny neuropatologicznej.

13. Do badania funkcji poznawczej u młodych dorosłych wykorzystuje się inną grupę 20 młodych/płeć/dawkę (tj. 1 samca i 1 samicę na miot). Spośród nich 10 zwierząt/płeć/dawkę (tj. 1 samiec lub 1 samica na miot) zostaje uśmierconych na koniec badania, a ich mózgi są usuwane i ważone.

Tabela 3

Nr młodego [a]		Liczba młodych przydzielonych do badania	Badanie
m	f		
1	5	10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria w dniu 11 po urodzeniu
		10 m + 10 f	Masa mózgu w dniu 11 po urodzeniu
2	6	20 m + 20 f	Rozwój zachowań (aktywność ruchowa)
		20 m + 20 f	Aktywność ruchowa
		20 m + 20 f	Dojrzewanie płciowe
		20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (dzień 27 po urodzeniu)
3	7	20 m + 20 f	Reakcja na nagły dźwięk (osobniki dojrzewające i młode dorosłe)
		20 m + 20 f	Szczegółowe obserwacje kliniczne
		10 m + 10 f	Masa mózgu/neuropatologia/morfometria młodego dorosłego w dniu 70 po urodzeniu
4	8	20 m + 20 f	Uczenie się i pamięć (młode dorosłe)
		10 m + 10 f	Masa mózgu młodego dorosłego

[a] W tym przykładzie mioty zostały ograniczone do 4 samców (m) + 4 samic (f); młode samce oznaczono numerami od 1 do 4, a młode samice od 5 do 8.

Dodatek 2

Definicje:

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

B.54. TEST BIOLOGICZNY WZROSTU MACICY U GRYZONI: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE WŁAŚCIWOŚCI ESTROGENNYCH

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 440 (2007 r.). W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych na potrzeby badań przesiewowych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (1). Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznych dotyczących biologicznego testu wzrostu macicy u gryzoni. Test biologiczny wzrostu macicy u gryzoni był następnie przedmiotem rozszerzonego programu walidacyjnego, obejmującego sporządzenie szczegółowego dokumentu ramowego (2)(3) i przeprowadzenie obszernych wewnątrz- i międzylaboratoryjnych badań celem wykazania istotności i odtwarzalności testu biologicznego przy użyciu silnego estrogenu referencyjnego, słabych agonistów receptorów estrogenowych, silnego antagonisty receptorów estrogenowych oraz negatywnej chemicznej substancji odniesienia (4)(5)(6)(7)(8)(9). Przedmiotowa metoda badawcza B.54 została opracowana w oparciu o doświadczenia zdobyte w trakcie programu badań walidacyjnych i wyniki otrzymane za pomocą agonistów estrogennych w ramach tego programu.

2. Test biologiczny wzrostu macicy jest krótkoterminowym badaniem przesiewowym, zapoczątkowanym w latach 30. ubiegłego wieku (27)(28); po raz pierwszy został poddany standaryzacji w odniesieniu do badań przesiewowych przez komitet ekspertów w 1962 r. (32)(35). Test ten polega na zwiększeniu masy macicy lub reakcji polegającej na zwiększeniu masy macicy (w celu dokonania przeglądu zob. pkt 29). Test pozwala dokonać oceny zdolności substancji chemicznej do wywoływania aktywności biologicznej zgodnej z aktywnością agonistów i antagonistów naturalnych estrogenów (np. estradiolu 17-beta), jednak jest znacznie rzadziej wykorzystywany do wykrywania antagonistów niż do wykrywania agonistów. Macica reaguje na estrogeny na dwa sposoby. Wstępną reakcją jest wzrost masy w związku z imbibicją wody. Następnie dochodzi do przyrostu masy w związku ze rozrostem tkanki (30). Reakcje macicy u szczurów i myszy są porównywalne pod względem jakościowym.

3. Przedmiotowy test pełni rolę badania przesiewowego *in vivo* i jego stosowanie należy postrzegać w kontekście ram koncepcyjnych OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (»OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals«) (dodatek 2). W powyższych ramach koncepcyjnych test biologiczny wzrostu macicy przypisano do poziomu 3 jako test *in vivo* pozwalający uzyskać dane dotyczące pojedynczego mechanizmu układu hormonalnego, tj. estrogenności.

4. Biologiczny test wzrostu macicy ma zostać włączony do zestawu badań *in vitro* i *in vivo* w celu identyfikacji substancji chemicznych, które mogą wchodzić w interakcje z układem hormonalnym, co ostatecznie doprowadzi do oceny ryzyka w odniesieniu do zdrowia ludzi i środowiska. W programie walidacyjnym OECD zastosowano zarówno silnych, jak i słabych agonistów estrogenu, aby ocenić skuteczność testu pod względem identyfikacji estrogennych substancji chemicznych (4)(5)(6)(7)(8). W ten sposób oprócz wykazania dobrej odtwarzalności wewnątrz- i międzylaboratoryjnej doskonale wykazano także czułość procedury badawczej dla agonistów estrogenu.

5. Jeżeli chodzi o negatywne związki chemiczne, do programu walidacyjnego włączono zaledwie jedną »negatywną« chemiczną substancję odniesienia, w stosunku do której zgłoszono wynik negatywny w biologicznym teście wzrostu macicy, jak również w wiązaniu receptorowym *in vitro*, ale oceniono dodatkowe dane z badań niepowiązane z programem walidacyjnym OECD, przedstawiając dalsze dowody na swoistość biologicznego testu wzrostu macicy w odniesieniu do badań przesiewowych agonistów estrogenu (16).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

6. Agoniści i antagoniści estrogenu działają jako ligandy w stosunku do receptorów estrogenowych a i b i mogą, odpowiednio, aktywować lub hamować działanie transkrypcyjne receptorów. Może powodować to niepożądane zagrożenia dla zdrowia, w tym wpływ na reprodukcję i rozwój. W związku z tym istnieje potrzeba dokonania oceny i zbadania substancji chemicznej jako potencjalnego agonisty lub antagonisty estrogenu. Powinowactwo ligandu wobec receptora estrogenu lub aktywacja transkrypcji genów reporterowych *in vitro*, mimo swojej wartości informacyjnej, stanowi tylko jeden z szeregu determinantów potencjalnego zagrożenia. Pozostałe determinanty mogą obejmować aktywację i dezaktywację metaboliczną w momencie dostania się do organizmu, dystrybucję do tkanek docelowych i klirens z organizmu, co najmniej częściowo w zależności od drogi podawania i badanej substancji chemicznej. Prowadzi to do konieczności przeprowadzenia badań *in vivo* ewentualnego działania substancji chemicznej w odpowiednich warunkach, chyba że odpowiednie informacje można już wywnioskować z właściwości danej substancji chemicznej w odniesieniu do wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania. Reakcją tkanek macicy na stymulację estrogenami jest nagły i silny wzrost, w szczególności u gryzoni laboratoryjnych, w przypadku których cykl estrogenowy trwa około 4 dni. Gryzonie, a w szczególności szczury, wykorzystuje się także powszechnie w badaniach toksyczności do celów charakteryzowania zagrożeń. W związku z tym macica gryzoni jest odpowiednim organem docelowym wykorzystywanym do celów badań przesiewowych *in vivo* dotyczących agonistów i antagonistów estrogenu.

7. Przedmiotową metodę badawczą opracowano w oparciu o protokoły wykorzystywane w badaniu walidacyjnym OECD, które okazały się być wiarygodne i powtarzalne w badaniach wewnątrz- i międzylaboratoryjnych (5)(7).

Obecnie dostępne są dwie metody, a mianowicie wykorzystywanie dorosłych samic poddanych owariektomii (metoda badania dorosłych osobników poddanych owariektomii) i wykorzystywanie niedojrzałych osobników niepoddanych owariektomii (metoda badania młodych osobników). W przypadku obu metod, w ramach programu walidacyjnego OECD, wykazano porównywalną czułość i odtwarzalność. Metoda badania niedojrzałych osobników jest jednak w pewnym stopniu mniej szczegółowa, ponieważ posiadają one nienaruszoną oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG), ale obejmuje szerszy zakres badania niż metoda badania zwierzęcia poddanego owariektomii, ponieważ zwierzę niedojrzałe może reagować na substancje chemiczne, które wchodzą w interakcje z osią podwzgórze–przysadka–gonady, a nie tylko z receptorem estrogenu. W przypadku szczurów oś podwzgórze–przysadka–gonady staje się funkcjonalna w wieku około 15 dni. Zanim to nastąpi, nie można przyspieszyć momentu osiągnięcia przez zwierzę dojrzałości płciowej, podając mu na przykład gonadoliberynę (GnRH). W momencie osiągania przez samice dojrzałości płciowej, jeszcze przed otwarciem pochwy, u samicy wystąpi szereg cykli bezowulacyjnych, w wyniku których nie dojdzie do otwarcia pochwy lub owulacji, ale zajdą pewne zmiany hormonalne. W przypadku gdy substancja chemiczna bezpośrednio lub pośrednio stymuluje oś podwzgórze–przysadka–gonady, następuje wczesne dojrzewanie, wczesna owulacja i przyspieszone otwarcie pochwy. Powodują to nie tylko substancje chemiczne oddziałujące na oś podwzgórze–przysadka–gonady, ale też niektóre pasze, zawierające wyższe poziomy metabolizowalnej energii niż pozostałe, będą stymulowały wzrost i przyspieszały otwarcie pochwy, nie posiadając przy tym właściwości estrogennych. Takie substancje chemiczne nie wywoływałyby reakcji wzrostu macicy u dorosłych zwierząt poddanych owariektomii, ponieważ w ich przypadku oś podwzgórze–przysadka–gonady nie funkcjonuje.

8. Ze względu na dobrostan zwierząt należy stosować przede wszystkim taką metodę, która polega na wykorzystaniu niedojrzałych szczurów, unikając wykonywania na zwierzętach wstępnych zabiegów chirurgicznych a także potencjalnego niewykorzystania tych zwierząt, które wykazują oznaki wejścia w cykl estrogenowy (zob. pkt 30).

9. Reakcja wzrostu macicy nie jest wyłącznie pochodzenia estrogennego, tj. reakcję tę mogą powodować także substancje chemiczne inne niż agoniści lub antagoniści estrogenów. Przykładowo podawanie stosunkowo wysokich dawek progesteronu, testosteronu lub różnych progestagenów syntetycznych może prowadzić do reakcji stymulującej (30). Każda reakcja może być poddana analizie histologicznej, aby wykazać keratynizację i rogowacenie pochwy (30). Niezależnie od ewentualnej przyczyny reakcji uzyskanie dodatniego wyniku biologicznego testu wzrostu macicy powinno z reguły prowadzić do działań zmierzających do dalszych wyjaśnień. Dodatkowe dowody wskazujące na estrogenność mogą pochodzić z testów *in vitro*, takich jak testy wiązań receptora estrogenu i badania aktywacji transkrypcji, lub z innych testów *in vivo*, takich jak test dojrzałości płciowej samic.

10. Biorąc pod uwagę, że test biologiczny wzrostu macicy pełni rolę badania przesiewowego *in vivo*, przyjęte podejście walidacyjne uwzględniało zarówno dobrostan zwierząt, jak i wielopoziomową strategię badań. W tym celu główny nacisk kładziono na rygorystyczną walidację odtwarzalności i czułości w odniesieniu do estrogenności stanowiącej kluczową kwestię w odniesieniu do wielu substancji chemicznych, natomiast niewielką uwagę przywiązywano do kwestii dotyczącej antyestrogenności testu. Zbadano tylko jeden antyestrogen o silnym działaniu, ponieważ liczba substancji chemicznych o wyraźnym profilu antyestrogennym (niezakłóconym przez aktywność estrogenową) jest bardzo ograniczona. W związku z tym przedmiotowa metoda badawcza przeznaczona jest dla protokołu estrogennego, natomiast protokół opisujący tryb testu dotyczący antagonistów zawarto w wytycznych (37). Odtwarzalność i czułość testu na obecność substancji chemicznych charakteryzujących się wyłącznie działaniem antyestrogennym zostanie doprecyzowana w dalszej kolejności, kiedy procedura badawcza będzie już przez jakiś czas stosowana rutynowo i zidentyfikowana zostanie większa liczba substancji chemicznych charakteryzujących się takim działaniem.

11. Uznano, że wszelkie procedury z wykorzystaniem zwierząt będą zgodne z lokalnymi normami w zakresie opieki nad zwierzętami; przedstawione poniżej opisy dotyczące opieki nad zwierzętami i ich traktowania stanowią minimalne standardy wykonywania badań i zostaną zastąpione przez lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (38). OECD zapewnia dalsze wytyczne dotyczące humanitarnego traktowania zwierząt (25).

12. Podobnie jak w przypadku wszystkich testów, w których wykorzystuje się żywe zwierzęta, niezwykle istotne jest dopilnowanie przed rozpoczęciem testu, aby dane były faktycznie potrzebne. Przykładowo dwie sytuacje, w których dane takie mogą być wymagane, to:

— wysokie prawdopodobieństwo narażenia (poziom 1 ram koncepcyjnych, dodatek 2) lub prawdopodobieństwo estrogenności (poziom 2) w celu zbadania, czy takie działania mogą wystąpić *in vivo*,

— działania wskazujące na estrogenność na poziomie 4 lub 5 badania *in vivo* w celu uzasadnienia, że działania te były związane z mechanizmem estrogennym, który nie mógłby zostać wyjaśniony za pomocą badania *in vitro*.

13. Definicje stosowane w tej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

14. Test biologiczny wzrostu macicy w odniesieniu do swojej czułości opiera się na systemie badań na zwierzętach, u których oś podwzgórze-przysadka-jajnik nie funkcjonuje, co prowadzi do niskich endogennych poziomów cyrkulacji estrogenu. Zapewni to niską początkowa masę macicy i maksymalny zakres reakcji na podawane estrogeny. Następujące dwa stany wrażliwości na estrogeny u samic gryzoni spełniają ten wymóg:

(i) niedojrzałe samice po odsadzeniu i przed osiągnięciem dojrzałości płciowej; oraz

(ii) młode dojrzałe samice poddane owariektomii, u których zapewniono odpowiedni czas na regresję tkanek macicy.

15. Badaną substancję chemiczną podaje się codziennie przez sondę drogą doustną lub przez podskórne wstrzyknięcie. Stopniowane dawki badanej substancji chemicznej podaje się co najmniej dwóm grupom badanych (w celu uzyskania wskazówek zob. pkt 33) zwierząt doświadczalnych, stosując taką samą dawkę w każdej grupie i okres podawania wynoszący trzy kolejne dni w odniesieniu do metody badania osobników niedojrzałych oraz okres podawania wynoszący co najmniej trzy kolejne dni w odniesieniu do metody badania dorosłych osobników poddanych owariektomii. Zwierzęta poddaje się sekcji po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. W przypadku agonistów estrogenu szacuje się średnią masę macicy badanych grup zwierząt w odniesieniu do grupy kontrolnej nośnika w celu wykrycia istotnych statystycznie wzrostów. Statystycznie istotny wzrost średniej masy macicy w grupie badanej wskazuje na dodatnią reakcję będącą wynikiem tego testu biologicznego.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Wybór gatunków zwierząt

16. Do badań wykorzystuje się powszechnie stosowane laboratoryjne szczepy gryzoni. Przykładowo podczas walidacji wykorzystano szczury szczepu Sprague-Dawley i Wistar. Nie należy wykorzystywać szczepów, w przypadku których stwierdzono lub podejrzewa się, że macice zwierząt mają mniejszą zdolność do wykazywania reakcji. Laboratorium powinno wykazać czułość wykorzystywanego szczepu zgodnie z opisem w punktach 26 i 27.

17. Szczury i myszy wykorzystywano do celów biologicznego testu wzrostu macicy od lat 30. ubiegłego stulecia. Badania walidacyjne OECD przeprowadzano jedynie u szczurów, opierając się na założeniu, że oba gatunki powinny być równoważne, w związku z tym jeden gatunek powinien wystarczyć do przeprowadzenia ogólnoświatowej walidacji dla oszczędzenia zasobów i zwierząt. Szczur jest gatunkiem preferowanym w przypadku większości badań toksyczności reprodukcyjnej i rozwojowej. Biorąc pod uwagę, że istnieje obszerna historyczna baza danych dotyczących myszy, przeprowadzono ograniczone uzupełniające badanie walidacyjne na tym gatunku w celu rozszerzenia zakresu metody testu biologicznego wzrostu macicy w odniesieniu do gryzoni na myszy jako gatunek eksperymentalny (16). Zgodnie z pierwotnym zamiarem oszczędzania zasobów i zwierząt wybrano stosowanie podejścia pomostowego polegającego na wykorzystywaniu ograniczonej liczby badanych substancji chemicznych, ograniczonej liczbie uczestniczących laboratoriów i nieprzeprowadzaniu badań kodowanych próbek. Przedmiotowe pomostowe badanie walidacyjne wykazało w odniesieniu do biologicznego testu wzrostu macicy u młodych dojrzałych myszy poddanych owariektomii, że dane otrzymane w przypadku szczurów i myszy odpowiadają sobie nawzajem pod względem jakościowym i ilościowym. W przypadkach, w których wynik biologicznego testu wzrostu macicy może poprzedzić badanie długoterminowe, możliwe jest wykorzystanie w obu badaniach zwierząt tego samego szczepu i pochodzących z tego samego źródła. Podejście pomostowe ograniczono do myszy poddanych owariektomii, a sprawozdanie nie zapewnia solidnego zbioru danych, aby dokonać walidacji modelu badań niedojrzałych osobników, w związku z czym model ten nie jest objęty zakresem bieżącej metody badawczej.

18. W związku z tym w niektórych przypadkach dopuszcza się wykorzystywanie myszy zamiast szczurów. Należy uzasadnić wykorzystanie tego gatunku w oparciu o kryteria toksykologiczne, farmakokinetyczne lub inne. W przypadku myszy może zajść konieczność modyfikacji protokołu. Przykładowo spożycie pokarmu przez myszy określane na podstawie masy ciała jest wyższe niż u szczurów, w związku z czym zawartość fitoestrogenów w karmie podawanej myszom powinna być niższa niż w karmie podawanej szczurom (9)(20)(22).

Warunki trzymania i żywienia

19. Wszystkie procedury powinny być zgodne z lokalnymi normami w zakresie opieki nad zwierzętami w warunkach laboratoryjnych. Opisy dotyczące opieki nad zwierzętami i ich traktowania stanowią minimalne normy i zostaną zastąpione przez lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (38). Temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (w przybliżeniu z tolerancją ± 3 °C). Wilgotność względna, poza okresem czyszczenia pomieszczenia, powinna wynosić co najmniej 30 % i nie przekraczać 70 %. Wilgotność względną należy docelowo utrzymywać w granicach 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

20. Należy zapewnić paszę laboratoryjną i wodę pitną *ad libitum*. Młode dorosłe zwierzęta mogą być trzymane pojedynczo lub umieszczane w klatkach w grupach o liczebności nieprzekraczającej trzech zwierząt. Z uwagi na młody wiek niedojrzałych zwierząt zaleca się trzymanie ich w grupach społecznych.

21. Stwierdzono, że wysoka zawartość fitoestrogenów w paszach laboratoryjnych zwiększa masę macicy u gryzoni w stopniu wystarczającym, by zakłócało to wyniki biologicznego testu wzrostu macicy (13)(14)(15). Wysokie poziomy fitoestrogenów i metabolizowalnej energii w paszach laboratoryjnych mogą powodować także wczesne dojrzewanie płciowe w przypadkach, w których wykorzystuje się zwierzęta niedojrzałe. Obecność fitoestrogenów wynika przede wszystkim z dodawania wyrobów z soi i lucerny do pasz laboratoryjnych, a do tego wykazano, że partie standardowych pasz laboratoryjnych różnią się między sobą pod względem stężenia fitoestrogenów (23). Istotną zmienną jest masa ciała, ponieważ ilość spożywanego pokarmu ma związek z masą ciała. W związku z tym rzeczywista dawka spożywanych fitoestrogenów z tej samej paszy może różnić się między gatunkami i w zależności od wieku (9). W przypadku niedojrzałych samic szczurów spożycie pokarmu określane na podstawie masy ciała może być prawie dwa razy większe niż w przypadku młodych dorosłych samic poddanych owariektomii. W przypadku młodych dorosłych samic myszy spożycie pokarmu określane na podstawie masy ciała może być prawie cztery razy większe niż w przypadku młodych dorosłych samic szczurów poddanych owariektomii.

22. Wyniki biologicznego testu wzrostu macicy (9)(17)(18)(19) wykazują jednak, że ograniczone ilości fitoestrogenów w paszy są dopuszczalne i nie powodują obniżenia czułości testu biologicznego. Orientacyjnie zawartość fitoestrogenów nie powinna przekraczać 350 µg odpowiedników genisteiny/gram paszy laboratoryjnej w przypadku niedojrzałych samic szczurów szczepów Sprague Dawley i Wistar (6)(9). Takie pasze powinny także mieć zastosowanie w przypadku badania młodych dorosłych szczurów poddanych owariektomii, ponieważ spożycie pokarmu w stosunku do masy ciała jest niższe w przypadku młodych dorosłych zwierząt niż w przypadku zwierząt niedojrzałych. Jeżeli planuje się wykorzystanie myszy poddanych owariektomii lub szczurów o zwiększonej wrażliwości na fitoestrogeny, należy rozważyć proporcjonalne obniżenie zawartości fitoestrogenów w paszy (20). Ponadto różnice w metabolizowalnej energii dostępnej w różnych paszach mogą prowadzić do zmian czasowych w osiąganiu dojrzałości płciowej (21)(22).

23. Przed przeprowadzeniem badania wymagany jest ostrożny wybór paszy niezawierającej podwyższonego poziomu fitoestrogenów (aby uzyskać wytyczne zob. (6)(9)) lub metabolizowalnej energii, które mogą zakłócić wyniki (15)(17)(19)(22)(36). Zapewnienie właściwej wydajności systemu badań wykorzystywanego przez laboratorium, zgodnie z punktem 26 i 27, jest istotnym elementem sprawdzającym oba te czynniki. W ramach zabezpieczenia zgodnie z dobrą praktyką laboratoryjną (DPL) należy pobrać reprezentatywną próbkę spośród każdej serii paszy podawanej w trakcie badania w celu przeprowadzenia ewentualnej analizy zawartości fitoestrogenów (np. w przypadku wysokiej masy macicy osobników kontrolnych w stosunku do historycznych danych dotyczących osobników kontrolnych lub w przypadku wystąpienia nieodpowiedniej reakcji na estrogen referencyjny, tj. etynyloestradiol 17-alfa). Należy przeprowadzić analizę podwielokrotności próbek w trakcie badania lub po zamrożeniu w temperaturze – 20 °C, bądź też w sposób pozwalający na zapobieżenie rozkładowi próbki przed poddaniem jej analizie.

24. Niektóre materiały ściółkowe mogą zawierać naturalnie występujące chemiczne substancje estrogenowe lub antyestrogenowe (np. wiadomo, że kolba kukurydzy wpływa na cykliczność u szczurów i wydaje się mieć działanie antyestrogenne). Wybrany materiał ściółkowy powinien zawierać możliwie jak najniższy poziom fitoestrogenów.

Przygotowanie zwierząt

25. Zwierzęta doświadczalne niewykazujące żadnych oznak choroby lub wad fizycznych są losowo przydzielane do grup kontrolnych i grup badanych. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Zwierzęta należy identyfikować pojedynczo. Preferuje się, aby niedojrzałe zwierzęta trzymane były w klatkach z matkami lub matkami zastępczymi do momentu odsadzenia podczas aklimatyzacji. Okres aklimatyzacji przed rozpoczęciem badania powinien trwać około 5 dni w odniesieniu do młodych dorosłych zwierząt i zwierząt niedojrzałych trzymanych z matkami lub matkami zastępczymi. W przypadkach, w których niedojrzałe zwierzęta dostarczono jako młode odsadzone bez matek, konieczne może być zastosowanie krótszego czasu trwania okresu aklimatyzacji, ponieważ dawkowanie należy rozpocząć natychmiast po odsadzeniu (zob. pkt 29).

PROCEDURA

Weryfikacja biegłości laboratorium

26. W celu dokonania weryfikacji biegłości laboratorium można zastosować następujące dwa warianty:

— weryfikację okresową, polegając na wstępnym badaniu początkowym dodatniej kontroli (zob. punkt 27). Co najmniej raz na 6 miesięcy i za każdym razem, gdy wykaże się zmianę mogącą mieć wpływ na wydajność testu (np. w przypadku nowej postaci paszy, zmiany pracowników przeprowadzających sekcje, zmiany szczepu zwierząt lub dostawcy itd.), zdolność reakcji systemu badań (modelu zwierzęcego) powinna być weryfikowana przy użyciu odpowiedniej dawki (w oparciu o badanie początkowe dodatniej kontrolni omówione w pkt 27) estrogenu referencyjnego, tj. etynyloestradiolu 17-alfa (nr CAS 57-63-6) (EE),

— zastosowanie równoległych kontroli poprzez włączenie grupy, w której podano odpowiednią dawkę estrogenu referencyjnego w każdym teście.

Jeżeli system nie wykaże oczekiwanej reakcji, należy zbadać warunki doświadczalne i w odpowiedni sposób je zmodyfikować. Zaleca się, aby stosowana dawka estrogenu referencyjnego w przypadku obu wariantów wynosiła około ED70–80.

27. **Początkowe badanie kontroli dodatniej** — zanim w laboratorium po raz pierwszy przeprowadzi się badanie w ramach tej metody badawczej, należy wykazać biegłość laboratorium poprzez zbadanie zdolności do reakcji modelu zwierzęcego w drodze ustalenia reakcji na dawkę estrogenu referencyjnego: etynyloestradiolu 17-alfa (nr CAS 57-63-6) (EE), stosując co najmniej cztery dawki. Reakcja dotycząca masy macicy zostanie porównana z określonymi danymi historycznymi (zob. pozycja bibliografii nr (5)). W przypadku gdy powyższe początkowe badanie kontroli dodatniej nie przyniesie oczekiwanych wyników, należy zbadać warunki doświadczalne i je zmodyfikować.

Liczba i stan zwierząt

28. Każda badana i kontrolna grupa powinna zawierać co najmniej 6 zwierząt (zarówno w odniesieniu do protokołu metody badania osobników niedojrzałych, jak i dorosłych osobników poddanych owariektomii).

Wiek niedojrzałych zwierząt

29. W przypadku biologicznego testu wzrostu macicy przeprowadzanego na niedojrzałych zwierzętach należy dokładnie określić dzień ich narodzin. Dawkowanie należy rozpocząć wystarczająco wcześnie celem zapewnienia, by na zakończenie podawania badanej substancji chemicznej nie wystąpił jeszcze fizjologiczny wzrost endogennych estrogenów towarzyszących dojrzałości płciowej. Istnieją natomiast dowody wskazujące na fakt, że młode zwierzęta mogą być mniej wrażliwe. W celu określenia optymalnego wieku każde laboratorium powinno wziąć pod uwagę swoje własne podstawowe dane dotyczące dojrzałości.

Jako ogólna wytyczna dawkowanie u szczurów można rozpocząć natychmiast po wczesnym odsadzeniu w dniu 18 po urodzeniu (przy czym dniem narodzin jest dzień 0). Preferowanym dniem zakończenia dawkowania u szczurów jest dzień 21 po urodzeniu, jednak w każdym przypadku dawkowanie należy zakończyć przed dniem 25 po urodzeniu, ponieważ po przekroczeniu tego wieku oś podwzgórze-przysadka-jajnik staje się funkcjonalna oraz może nastąpić wzrost poziomu endogennego estrogenu, a co za tym idzie wzrost podstawowych średnich mas macic i wzrost w grupowych odchyleniach standardowych (2)(3)(10)(11)(12).

Procedura wycięcia jajników

30. W przypadku samic szczurów i myszy poddanych owariektomii (w grupie badanej i kontrolnej), owariektomia powinna być wykonana w 6–8 tygodniu życia. W przypadku szczurów od momentu przeprowadzenia owariektomii do pierwszego dnia dawkowania powinno upłynąć co najmniej 14 dni, aby umożliwić regres macicy do minimalnego, stabilnego poziomu podstawowego. W przypadku myszy od momentu przeprowadzenia owariektomii do pierwszego dnia dawkowania powinno upłynąć co najmniej 7 dni. Ponieważ wystarczają niewielkie ilości tkanki jajnikowej, aby wytwarzać znaczne stężenia estrogenów (3), przed ich wykorzystaniem należy poddać zwierzęta badaniu polegającym na obserwacji komórek nabłonkowych pobieranych z pochwy przez co najmniej pięć kolejnych dni (np. w dniach 10–14 po przeprowadzeniu owariektomii w przypadku szczurów). Jeżeli u zwierząt występują jakiekolwiek oznaki wejścia w cykl owulacyjny, nie powinno się ich wykorzystywać do badań. Ponadto w trakcie sekcji należy zbadać pozostałości jajnikowe w celu uzyskania dowodów wskazujących na obecność tkanki jajnikowej. W przypadku wykrycia obecności tkanki jajnikowej zwierzęcia nie należy uwzględniać w obliczeniach (3).

31. Zabieg owariektomii rozpoczyna się po odpowiednim znieczuleniu zwierzęcia i ułożeniu go w pozycji leżącej na brzuchu. Nacięcie otwierające grzbietowo-boczną ścianę brzucha powinno być wykonane na długości około 1 cm w środkowym punkcie między dolną granicą żeber a grzebieniem biodrowym oraz kilka milimetrów w kierunku poprzecznym do bocznej granicy mięśnia lędźwiowego. Należy usunąć jajnik z jamy brzusznej i przenieść go do aseptycznego pojemnika. Jajnik należy odciąć na połączeniu jajowodu z trzonem macicy. Po stwierdzeniu, że nie wystąpiło znaczne krwawienie, należy zamknąć ścianę brzucha poprzez założenie szwu oraz zamknąć skórę klipsami lub użyć odpowiedniego szwu. Punkty podwiązania przedstawiono schematycznie na rys 1. Zgodnie z zaleceniem lekarza weterynarii posiadającego doświadczenie w opiece nad gryzoniami należy zastosować pooperacyjną analgezję.

Masa ciała

32. W przypadku metody badania poddanych owariektomii osobników dorosłych masa ciała i masa macicy nie są ze sobą skorelowane, ponieważ na masę macicy wpływ mają hormony, takie jak estrogeny, a nie czynniki wzrostowe regulujące masę ciała. Natomiast masa ciała jest powiązana z masą macicy w modelu badania niedojrzałych osobników w trakcie dojrzewania (34). Zatem na początku badania zróżnicowanie mas ciała u zwierząt wykorzystywanych w tym badaniu, w przypadku modelu badania niedojrzałych osobników, powinno być jak najmniejsze i nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy. Oznacza to, że liczebność miotu powinna być znormalizowana przez

hodowcę, aby potomstwo różnych matek było karmione mniej więcej w takich samych ilościach. Zwierzęta należy przydzielić do grup (kontrolnych i badanych), stosując losowy rozkład mas, aby średnia masa ciała w każdej grupie nie różniła się statystycznie od średnich innych grup. Należy wziąć pod uwagę konieczność unikania w miarę możliwości umieszczania młodych z jednego miotu w tej samej grupie badanej, bez potrzeby zwiększania liczby miotów wykorzystywanych do celów badania.

Dawkowanie

33. W celu ustalenia, czy badana substancja chemiczna może mieć działanie estrogenne *in vivo*, zazwyczaj wystarczą dwie grupy dawkowania i jedna grupa kontrolna i takie rozwiązanie jest w związku z tym preferowane ze względu na dobrostan zwierząt. Jeżeli celem jest uzyskanie krzywej dawka-efekt lub ekstrapolacja do mniejszych dawek, potrzebne są co najmniej 3 grupy dawkowania. Jeżeli wymagane są informacje wykraczające poza identyfikację aktywności estrogennej (takie jak szacunki dotyczące aktywności), należy rozważyć zastosowanie innego schematu dawkowania. Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej, zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej jest stosowany nośnik, grupa kontrolna powinna otrzymać taką samą ilość nośnika, jakiej używa się w przypadku badanych grup (lub największą objętość nośnika, jaką użyto w przypadku badanych grup, jeżeli różni się ona między grupami).

34. W przypadku biologicznego testu wzrostu macicy celem jest dokonanie wyboru dawek, które zapewniają przeżycie zwierząt i które nie mają istotnego działania toksycznego lub nie powodują stresu u zwierząt po upływie trzech kolejnych dni podawania badanej substancji chemicznej w dawce nieprzekraczającej 1 000 mg/kg/dzień. Wszystkie dawki należy proponować i dobierać z uwzględnieniem wszelkich istniejących danych dotyczących toksyczności i danych (toksyko)kinetycznych dostępnych w odniesieniu do badanej substancji chemicznej lub powiązanych materiałów. W przypadku najwyższej dawki należy najpierw uwzględnić medialną dawkę śmiertelną (LD50) lub dane dotyczące ostrej toksyczności w celu uniknięcia śmierci, dotkliwego cierpienia i stresu zwierząt (24)(25)(26). Najwyższa dawka powinna odpowiadać maksymalnej tolerowanej dawce (MTD); badanie przeprowadzone z zastosowaniem dawki, która wywołała dodatnią reakcję wzrostu macicy, także byłoby dopuszczalne. W odniesieniu do badań przesiewowych zasadniczo dopuszczalne są duże odstępy pomiędzy kolejnym dawkowaniem (np. 0,5 jednostek logarytmicznych odpowiadających progresji dawki w wysokości 3,2 lub nawet do 1 jednostki logarytmicznej). W przypadku braku dostępności odpowiednich danych można przeprowadzić badanie ustalające zakres dawkowania, aby wspomóc określenie stosowanych dawek.

35. Ewentualnie, jeżeli aktywność estrogenną agonisty można oszacować na podstawie danych *in vitro* (lub *in silico*), dane te można uwzględnić przy doborze dawek. Przykładowo ilość badanej substancji chemicznej, która powodowałaby reakcje wzrostu macicy równoważne reakcji na agonistę odniesienia (etynyloestradiol), szacuje się na podstawie jej względnego oddziaływania *in vitro* na etynyloestradiol. Najwyższą dawkę badania otrzymano by poprzez pomnożenie tej analogicznej dawki przez odpowiedni współczynnik, np. 10 lub 100.

Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania

36. W razie potrzeby można przeprowadzić badanie ustalające zakres dawkowania z wykorzystaniem kilku zwierząt. Pod tym względem można zastosować wytyczną OECD nr 19 (25), w której przedstawiono objawy kliniczne wskazujące na działanie toksyczne lub stres u zwierząt. Jeżeli w ramach tego badania ustalającego zakres dawkowania po trzech dniach podawania jest to wykonalne, macice mogą zostać wycięte i zważone po upływie około 24 godzin od ostatniej dawki. Dane te mogą następnie zostać wykorzystane, aby wspomóc główny projekt badania (wybór dopuszczalnej dawki maksymalnej i dopuszczalnych niższych dawek oraz zalecenie liczby grup dawkowania).

Podawanie dawek

37. Badaną substancję chemiczną podaje się drogą doustną przez sondę lub przez podskórne wstrzyknięcie. Podczas dokonywania wyboru drogi podawania należy brać pod uwagę względy dotyczące dobrostanu zwierząt oraz aspekty toksykologiczne, takie jak związek z drogą narażenia na substancję chemiczną u ludzi (np. drogą doustną przez sondę jako odpowiednik spożycia substancji, podskórne wstrzyknięcie jako odpowiednik inhalacji lub wchłaniania przez skórę), właściwości fizykochemiczne badanego materiału, a w szczególności istniejące informacje toksykologiczne i dane dotyczące metabolizmu i kinetyki (np. konieczność unikania efektu pierwszego przejścia, zwiększona efektywność na skutek podania substancji określoną drogą).

38. Zaleca się, o ile jest to możliwe, rozważenie użycia w pierwszej kolejności roztworu wodnego/zawiesiny wodnej. Ponieważ jednak większość ligandów estrogenów lub ich metabolicznych prekursorów najczęściej wykazuje właściwości hydrofobowe, powszechnie stosowanym podejściem jest zastosowanie roztworu/zawiesiny w oleju (np. kukurydzianym, z orzechów arachidowych, sezamowym lub w oliwie z oliwek). Oleje te charakteryzują się jednak różnymi wartościami energetycznymi i zawartościami tłuszczu, w związku z czym nośnik może mieć wpływ na pobranie całkowitej metabolizowalnej energii (ME), potencjalnie zmieniając przez to mierzone punkty końcowe, takie jak masa macicy, w szczególności w przypadku zastosowania metody badania niedojrzałych osobników (33). W związku z tym przed rozpoczęciem badania każdy nośnik, który ma być użyty, powinien zostać przebadany na grupie kontrolnej bez nośników. Badane substancje chemiczne można rozpuścić w minimalnej ilości 95-procentowego etanolu lub w innych odpowiednich rozpuszczalnikach i rozcieńczyć w badanym nośniku do uzyskania końcowych roboczych stężeń. Należy znać właściwości toksyczne rozpuszczalnika i zbadać je na

oddzielnej grupie kontrolnej, w której zastosowano wyłącznie rozpuszczalnik. Jeżeli badana substancja chemiczna zostanie uznana za stabilną, można zastosować delikatne podgrzewanie i energiczne mechaniczne mieszanie w celu łatwiejszego rozpuszczenia badanej substancji chemicznej. Należy oznaczyć stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku. Jeżeli badana substancja chemiczna jest stabilna przez cały okres trwania badania, można wtedy przygotować jedną początkową podwielokrotność badanej substancji chemicznej, a określone rozcieńczenia dawek można przygotowywać na bieżąco codziennie.

39. Częstotliwość dawkowania będzie uzależniona od wykorzystanego modelu (aby uzyskać informacje na temat modelu niedojrzałych osobników, zob. pkt 29 i pkt 30, aby uzyskać informacje na temat modelu osobników poddanych owariektomii). Niedojrzałym samicom szczurów podaje się badaną substancję chemiczną codziennie przez trzy kolejne dni. Trzydniowy okres podawania zaleca się także w przypadku samic szczurów poddanych owariektomii, ale dopuszcza się dłuższe okresy narażenia, co może ułatwić wykrywanie substancji chemicznych charakteryzujących się słabą aktywnością. W przypadku samic myszy poddanych owariektomii 3-dniowy okres podawania powinien być wystarczający i przedłużenie tego okresu do siedmiu dni nie przyniesie żadnej istotnej korzyści w przypadku silnych agonistów estrogenów, jednakże nie wykazano takiego związku w odniesieniu do słabych estrogenów w badaniu walidacyjnym (16), zatem dawkowanie należy wydłużyć do 7 kolejnych dni w przypadku dorosłych myszy poddanych owariektomii.Dawkę należy podawać każdego dnia o takiej samej porze. W razie potrzeby dawki należy skorygować, aby utrzymać stały poziom dawki w stosunku do masy ciała zwierzęcia (np. jeden mg badanej substancji chemicznej na kilogram masy ciała na dobę). Biorąc pod uwagę objętość stosowaną w badaniu w stosunku do masy ciała, należy ograniczyć do minimum jej zmienność, dostosowując stężenie roztworu dozującego w celu zapewnienia stałej objętości w stosunku do masy ciała w odniesieniu do wszystkich dawek i do każdej drogi podawania.

40. W przypadkach, w których badaną substancję chemiczną podaje się przez sondę, należy to robić, podając zwierzętom pojedynczą dawkę dobową przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Należy przestrzegać lokalnych wytycznych dotyczących opieki nad zwierzętami, jednak przedmiotowa objętość nie powinna przekroczyć 5 ml/kg masy ciała, z wyjątkiem roztworów wodnych, w przypadku których można stosować objętość wynoszącą 10 ml/kg masy ciała.

41. Jeżeli badana substancja chemiczna podawana jest drogą wstrzyknięcia podskórnego, należy to robić, stosując pojedynczą dawkę dobową. Dawki należy podawać w okolice łopatki na grzbiecie lub w okolice lędźwi przy użyciu sterylnej igły (np. o rozmiarze 23 lub 25 G) lub strzykawki tuberkulinowej. Golenie miejsca wstrzyknięcia nie jest obowiązkowe. Należy odnotować wszelkie straty, wycieki w miejscu wstrzyknięcia lub przypadki niepełnego podania dawki. Łączna objętość wstrzykiwana jednemu szczurowi w ciągu doby nie powinna przekraczać 5 ml/kg masy ciała, rozdzielona na 2 miejsca wstrzyknięcia, z wyjątkiem roztworów wodnych, w przypadku których można stosować objętość wynoszącą 10 ml/kg masy ciała.

Obserwacje

Obserwacje ogólne i kliniczne

42. Ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać przynajmniej raz dziennie, a w przypadku zaobserwowania oznak toksyczności ze zwiększoną częstotliwością. Najlepiej jest prowadzić obserwacje o tych samych godzinach doby z uwzględnieniem okresu oczekiwanych skutków szczytowych po dawkowaniu. Należy prowadzić obserwacje zwierząt pod kątem śmiertelności, zachorowalności i ogólnych objawów klinicznych, takich jak zmiany w zachowaniu, skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, występowanie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenic, nietypowy rytm oddychania).

Masa ciała i spożycie pokarmu

43. Wszystkie zwierzęta należy codziennie ważyć z dokładnością do 0,1 g, zaczynając tuż przed rozpoczęciem dawkowania, tj. w momencie przydzielania zwierząt do grup. Nieobowiązkowo można mierzyć ilości spożywanego pokarmu przypadające na każdą klatkę w trakcie okresu dawkowania, ważąc w tym celu karmniki. Wyniki dotyczące spożycia pokarmu należy wyrażać w gramach na szczura na dobę.

Sekcja i pomiar masy macicy

44. Szczury zostaną uśmiercone w sposób humanitarny po upływie 24 godzin od ostatniej dawki. Najlepiej jest dokonywać sekcji na losowo wybranych zwierzętach z grup w celu uniknięcia progresji rosnącej lub malejącej w ramach grup dawkowania, co mogłoby nieznacznie wpłynąć na dane. Celem testu biologicznego jest dokonanie pomiaru masy zarówno mokrej, jak i osuszonej macicy. Mokra masa obejmuje macicę i zawartość płynu w świetle macicy. Pomiaru suchej masy dokonuje się po wydobyciu i usunięciu płynu w świetle macicy.

45. W przypadku niedojrzałych zwierząt przed przeprowadzeniem sekcji bada się pochwę pod kątem jej otwarcia. Sekcję rozpoczyna się od otwarcia ściany brzucha, zaczynając od spojenia łonowego. Następie z grzbietowej ściany brzucha usuwa się róg macicy i jajniki, jeżeli są obecne. Pęcherz moczowy i moczowody usuwane są z brzusznej i bocznej części macicy i pochwy. Następnie odłącza się zrost włóknisty między odbytnicą a pochwą do momentu, w którym można zidentyfikować miejsce złączenia ujścia pochwy i skóry krocza. Macicę i pochwę odłącza się od ciała poprzez wykonanie nacięcia ściany pochwy tuż nad miejscem złączenia ujścia pochwy i skóry krocza, jak przedstawiono na rys 2. Macicę należy odłączyć od ściany ciała, delikatnie przecinając krezki macicy w punkcie jej złączenia wzdłuż całej długości grzbietowo-bocznej części każdego rogu macicy. Po usunięciu macicy z ciała należy wystarczająco szybko ją zbadać, aby uniknąć osuszenia tkanek. Utrata wagi wynikająca z osuszenia jest istotniejsza w przypadku małych tkanek, takich jak tkanki macicy (23). Jeżeli jajniki są obecne, usuwa się je przy jajowodzie, unikając wypłynięcia płynu ze światła rogu macicy. W przypadku gdy zwierzęta poddano owariektomii, należy zbadać pozostałości pod kątem obecności tkanki jajnikowej. Nadmiar tłuszczu i tkanki łącznej należy usunąć. Pochwę usuwa się z macicy tuż pod szyjką, tak aby pozostawić szyjkę wraz z trzonem macicy, jak przedstawiono na rys. 2.

46. Każdą macicę należy umieścić w indywidualnie oznakowanym i zważonym pojemniku (np. w szalce Petriego lub szalce wagowej z tworzywa sztucznego), kontynuując działania zapobiegające osuszeniu przed ważeniem (np. w pojemniku można umieścić bibułę filtracyjną delikatnie zwilżoną solą fizjologiczną). Macicę z płynem w świetle macicy waży się z dokładnością do 0,1 mg (mokra masa macicy).

47. Następnie każdą macicę przetwarza się oddzielnie w celu usunięcia płynu. Oba rogi macicy nakłuwa się lub nacina podłużnie. Macicę umieszcza się na lekko zwilżonej bibule filtracyjnej (np. Whatman nr 3) i przyciska się drugim kawałkiem lekko zwilżonej bibuły filtracyjnej celem całkowitego usunięcia płynu. Macicę bez zawartości płynu w świetle waży się z dokładnością do 0,1 mg (sucha masa macicy).

48. Można wykorzystać masę macicy, jaką ustalono na koniec badania, aby zapewnić, że nie został przekroczony odpowiedni wiek niedojrzałych niebadanych szczurów, jednakże w tej kwestii decydujące znaczenie mają dane historyczne dotyczące szczepu szczurów wykorzystanego przez laboratorium (aby uzyskać szczegóły na temat interpretacji wyników, zob. pkt 56).

Badania nieobowiązkowe

49. Po zważeniu macicę można utrwalić w 10-procentowej obojętnej, zbuforowanej formalinie w celu przeprowadzenia badania histopatologicznego po zabarwieniu hematoksyliną i eozyną. Należy w podobny sposób zbadać pochwę (zob. pkt 9). Dodatkowo do celów porównania ilościowego można dokonać pomiaru morfometrycznego nabłonka błony śluzowej macicy.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

50. Dane uzyskane w ramach badania powinny obejmować:

— liczbę zwierząt na początku badania,

— liczbę i tożsamość zwierząt, które poniosły śmierć podczas badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, oraz datę i czas każdej śmierci lub każdego humanitarnego uśmiercenia,

— liczbę i tożsamość zwierząt wykazujących oznaki toksyczności oraz opis zaobserwowanych oznak toksyczności wraz z czasem ich wystąpienia, czasem trwania i stopniem dotkliwości każdego efektu toksycznego, oraz

— liczbę i tożsamość zwierząt wykazujących jakiekolwiek zmiany patologiczne oraz opis rodzaju tych zmian.

51. Należy rejestrować dane dotyczące masy ciała, mokrej masy macicy i suchej masy macicy poszczególnych zwierząt. Należy przeprowadzić jednostronne analizy statystyczne agonistów, aby określić, czy wynikiem podawania badanej substancji chemicznej był istotny statystycznie ($p < 0,05$) wzrost masy macicy. Należy wykonać odpowiednie analizy statystyczne, aby zbadać zmiany związane z dawkowaniem w przypadku suchej i mokrej masy macicy. Przykładowo oceny danych można dokonać, stosując analizę kowariancji (ANCOVA) z wykorzystaniem masy ciała w momencie przeprowadzania sekcji jako zmiennej towarzyszącej. Przed dokonaniem analizy danych można przeprowadzić logarytmiczną transformację stabilizującą wariancję z wykorzystaniem danych dotyczących macic. Test Dunnetta i Hsu jest odpowiedni do przeprowadzania porównań w parach z każdej grupy dawkowania z grupami kontrolnymi nośnika oraz do obliczania przedziałów ufności. W celu wykrycia ewentualnych wartości

odstających i dokonania oceny jednorodności wariancji można zastosować wykres pozostałości regresji. Powyższe procedury zastosowano w programie walidacyjnym OECD, wykorzystując wersję 8 programu PROC GLM w środowisku SAS (*Statistical Analysis System*) (SAS Institute, Cary, Karolina Północna) (6)(7).

52. Sprawozdanie końcowe musi zawierać następujące informacje:

Placówka badawcza:

— szczegóły dotyczące odpowiedzialnych pracowników i ich obowiązków w zakresie badań,

— dane z początkowego badania kontroli dodatniej i okresowe dane dotyczące dodatniej grupy kontrolnej (zob. pkt 26 i 27).

Badana substancja chemiczna:

— cechy charakterystyczne badanej substancji chemicznej,

— właściwości fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne,

— metody i częstotliwości przygotowywania rozcieńczeń,

— wszelkie dane dotyczące stabilności,

— wszelkie analizy roztworów dozujących.

Nośnik:

— charakterystyka badanego nośnika (charakter, dostawca i partia),

— uzasadnienie wyboru nośnika (jeśli jest inny niż woda).

Badane zwierzęta:

— gatunek i szczep oraz uzasadnienie ich wyboru,

— dostawca i określony obiekt dostawcy,

— wiek zwierząt w momencie dostarczenia i dzień narodzin,

— w przypadku niedojrzałych zwierząt informacje, czy zostały dostarczone z matką lub matką zastępczą, i data odsadzenia,

— szczegóły dotyczące procedur aklimatyzacji zwierząt,

— liczba zwierząt w każdej klatce,

— szczegóły i metody dotyczące identyfikacji pojedynczych zwierząt i grup zwierząt.

Warunki testu:

— szczegóły dotyczące procesu randomizacji (tj. stosowanej metody),

— uzasadnienie wyboru dawki,

— szczegóły dotyczące postaci badanej substancji chemicznej, osiąganych przez nią stężeń, stabilności i jednorodności,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej i uzasadnienie wyboru drogi narażenia,

— szczegóły dotyczące paszy (nazwa, rodzaj, dostawca, zawartość i, jeżeli są znane, poziomy fitoestrgenów),

— źródło wody (np. woda wodociągowa lub woda filtrowana) i sposób jej doprowadzenia (przewodami z dużego pojemnika, w butelkach itp.),

— ściółka (nazwa, rodzaj, dostawca, skład),

— rejestr warunków w klatce, okresów oświetlania, temperatury w pomieszczeniu i wilgotności, czyszczenia pomieszczenia,

— szczegółowy opis sekcji i procedur ważenia macic,

— opis procedur statystycznych.

Wyniki:

Poszczególne zwierzęta:

— wszystkie masy ciała poszczególnych zwierząt uzyskane w ramach codziennego ważenia (od momentu przydzielenia zwierząt do grup do sekcji) (z dokładnością do 0,1 g),

— wiek każdego zwierzęcia (w dniach, licząc dzień narodzin jako dzień 0) w momencie rozpoczęcia podawania badanej substancji chemicznej,

— data i czas podania każdej dawki,

— obliczona podana objętość i dawka oraz obserwacje dotyczące wszelkich strat związanych z dawkowaniem w trakcie podawania lub po podaniu,

— codzienny rejestr stanu zwierzęcia, w tym istotne objawy i obserwacje,

— podejrzewana przyczyna śmierci (w przypadku gdy w trakcie badania zwierzę padnie lub będzie w stanie agonalnym),

— data i czas humanitarnego uśmiercenia wraz z odstępem czasowym od ostatniego podania dawki,

— mokra masa macicy (z dokładnością do 0,1 mg) i wszelkie przypadki zaobserwowania utraty płynu w świetle macicy w trakcie sekcji i przygotowań do ważenia,

— sucha masa macicy (z dokładnością do 0,1 mg).

Każda grupa zwierząt:

— średnie masy ciała poszczególnych zwierząt uzyskane w ramach codziennego ważenia (z dokładnością do 0,1 g) i odchylenia standardowe (od momentu przydzielenia zwierząt do grup do sekcji),

— średnie masy wilgotnych macic i średnie masy osuszonych macic (z dokładnością do 0,1 mg) oraz odchylenia standardowe,

— dzienne spożycie pokarmu, jeżeli było mierzone (obliczane w gramach spożytego pokarmu na zwierzę),

— wyniki statystycznych analiz porównujących zarówno masy wilgotnych, jak i osuszonych macic badanych grup w stosunku do tych samych pomiarów przeprowadzonych w grupach kontrolnych nośnika,

— wyniki statystycznych analiz porównujących całkowitą masę ciała i przyrost masy ciała badanych grup w stosunku do tych samych pomiarów przeprowadzonych w grupach kontrolnych nośnika.

53. Podsumowanie istotnych orientacyjnych faktów dotyczących metody badawczej

	Szczury	**Myszy**
Zwierzęta		
Szczep	Powszechnie wykorzystywany szczep gryzoni doświadczalnych	
Liczba zwierząt	Co najmniej 6 zwierząt w każdej grupie dawkowania	
Liczba grup	Co najmniej 2 grupy badane (aby uzyskać wskazówki zob. pkt 33) i ujemna grupa kontrolna Aby uzyskać wskazówki dotyczące dodatnich grup kontrolnych zob. pkt 26 i 27	
Warunki trzymania i żywienia		
Temperatura w pomieszczeniu dla zwierząt (w °C)	22 °C ± 3 °C	
Wilgotność względna	50–60 %, ale nie mniej niż 30 % ani więcej 70 %	
Dobowy cykl oświetlenia	12 godzin światła, 12 godzin ciemności	
Pasza i woda pitna	Ad libitum	

	Szczury	Myszy
Utrzymywanie zwierząt	Pojedynczo lub w grupach o liczebności nieprzekraczającej trzech zwierząt (zaleca się trzymanie niedojrzałych zwierząt w grupach społecznych)	
Pasza i ściółka	Zaleca się wykorzystywanie pasz i ściółki zawierających niskie poziomy fitoestrogenów	
Protokół		
Metoda	Niedojrzałe zwierzęta nie poddane owariektomii (metoda preferowana). Metoda badań dorosłych samic poddanych owariektomii	Dorosłe samice poddane owariektomii
Wiek niedojrzałych zwierząt w momencie rozpoczęcia dawkowania	Najwcześniej w dniu 18 po urodzeniu. Należy zakończyć dawkowanie przed dniem 25 po urodzeniu	Nie dotyczy zakresu bieżącej metody badawczej
Wiek zwierzęcia w momencie poddania go owariektomii	6–8 tygodni życia	
Wiek zwierząt poddanych owariektomii w momencie rozpoczęcia dawkowania	Między przeprowadzeniem owariektomii a pierwszym dniem podawania powinno upłynąć co najmniej 14 dni	Między przeprowadzeniem owariektomii a pierwszym dniem podawania powinno upłynąć co najmniej 7 dni
Masa ciała	Zmienność masy ciała powinna być możliwie jak najmniejsza i nie powinna przekraczać ± 20 % średniej masy ciała	
Dawkowanie		
Droga podawania	Przez sondę drogą doustną lub przez podskórne wstrzyknięcie	
Częstotliwość podawania	Jedna dawka dziennie	
Objętość dawki podawanej przez sondę lub przez wstrzyknięcie	≤ 5 ml/kg masy ciała (lub maksymalnie 10 ml/kg masy ciała w przypadku roztworów wodnych) (podawane w 2 miejsca wstrzyknięcia w przypadku podskórnej drogi podawania)	
Czas trwania dawkowania	3 kolejne dni w przypadku modelu badania niedojrzałych zwierząt. Co najmniej 3 kolejne dni w przypadku modelu badania zwierząt poddanych owariektomii	7 kolejnych dni w przypadku modelu badania zwierząt poddanych owariektomii
Czas sekcji	Po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki	
Wyniki		
Reakcja dodatnia	Istotny statystycznie wzrost średniej masy macicy (mokrej lub suchej)	
Estrogen referencyjny	Etynyloestradiol 17-α	

WYTYCZNE DOTYCZĄCE INTERPRETACJI I ZATWIERDZENIA WYNIKÓW

54. Wynik badania estrogenności należy na ogół uznać za dodatni, jeżeli ma miejsce istotny statystycznie wzrost masy macicy ($p < 0,05$) przy wysokiej dawce w stosunku do grupy kontrolnej, w której zastosowano rozpuszczalnik. Wynik dodatni jest dodatkowo potwierdzany przez wykazanie wiarygodnego biologicznie związku między dawką a skalą reakcji, mając na uwadze fakt, że nakładające się na siebie działania estrogenne i antyestrogenne badanej substancji chemicznej mogą mieć wpływ na kształt krzywej dawka-odpowiedź.

55. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie przekroczyć maksymalnej tolerowanej dawki w celu umożliwienia wiarygodnej interpretacji danych. W związku z tym należy dokonywać starannej oceny spadku masy ciała, objawów klinicznych i pozostałych ustaleń.

56. Masy macic uzyskane w grupie kontrolnej nośnika są istotnymi czynnikami mającymi wpływ na zatwierdzenie danych wynikających z biologicznego testu wzrostu macicy. Wysokie wartości uzyskane w grupie kontrolnej mogą zaburzyć zdolność reakcji w teście biologicznym oraz zdolność wykrywania bardzo słabych agonistów estrogenu. Przeglądy literatury i dane otrzymane w trakcie walidacji biologicznego testu wzrostu macicy wskazują na spontaniczne przypadki występowania wysokich średnich w grupach kontrolnych, w szczególności w przypadku niedojrzałych zwierząt (2)(3)(6)(9). Ponieważ masa macicy u niedojrzałych szczurów zależy od wielu zmiennych, takich jak szczep lub masa ciała, nie można określić ostatecznej górnej granicy masy macicy. Dla orientacji, jeżeli suche masy macic u niedojrzałych szczurów w grupie kontrolnej wynoszą 40–45 mg, wyniki należy uznać za podejrzane, a uzyskanie mas macic przekraczających 45 mg może prowadzić do konieczności powtórzenia badania. Powyższe należy jednak rozpatrywać w odniesieniu do każdego przypadku indywidualnie (3)(6)(8). W przypadku przeprowadzania badań na dorosłych szczurach niepełna owariektomia może skutkować obecnością pozostałości tkanki jajnikowej, która może produkować endogenny estrogen i opóźniać regresję masy macicy.

57. Suche masy macic grupy kontrolnej nośnika, wynoszące mniej niż 0,09 % masy ciała w przypadku niedojrzałych samic szczurów i mniej niż 0,04 % w przypadku młodych dorosłych samic poddanych owariektomii, wydają się dawać dopuszczalne wyniki [zob. tabela 31 (2)]. Jeżeli masy macic w grupie kontrolnej przekroczą powyższe poziomy, należy skontrolować szereg różnych czynników, takich jak wiek zwierząt, poprawność wykonania owariektomii, poziom fitoestrogenów w paszy itd. oraz należy zachować ostrożność, wykorzystując ujemny wynik (brak oznak aktywności estrogennej) testu.

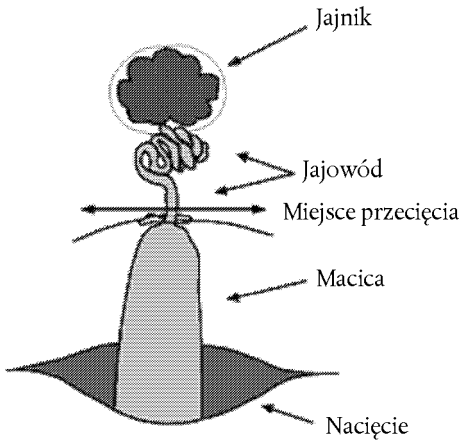
58. Należy zachować dane historyczne dotyczące grup kontrolnych nośnika w laboratorium. W laboratorium należy również zachować dane historyczne dotyczące reakcji na dodatnie estrogeny referencyjne, takie jak etynyloestradiol 17-a. W laboratoriach można także badać reakcje na znanych słabych agonistów estrogenów. Wszystkie powyższe dane mogą być porównywane z dostępnymi danymi (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), aby zapewnić odpowiednią czułość metod stosowanych w laboratorium.

59. W trakcie badania walidacyjnego OECD w przypadku suchych mas macic wykazano mniejszą zmienność niż w przypadku mokrej masy macic (6)(7). Istotna reakcja w przypadku któregokolwiek z powyższych pomiarów wskazywałaby na dodatni wynik aktywności estrogennej badanej substancji chemicznej.

60. Reakcja wzrostu macicy nie jest wyłącznie pochodzenia estrogennego, jednak dodatni wynik biologicznego testu wzrostu macicy należy ogólnie interpretować jako dowód wskazujący na potencjał estrogenowy *in vivo* i test powinien zazwyczaj prowadzić do podjęcia działań mających na celu uzyskanie dalszych wyjaśnień (zob. pkt 9 i »ramy koncepcyjne OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego« zawarte w dodatku 2).

Rysunek 1

Schemat przedstawiający chirurgiczne usuwanie jajników



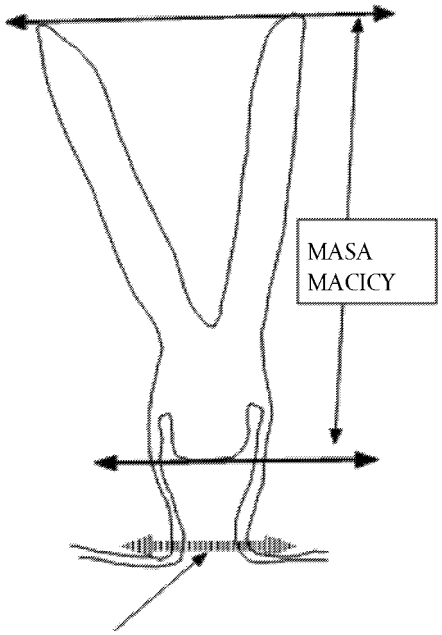
Na rys. nie pokazano krezki macicy, układu naczyniowego i ciała tłuszczowego

Zabieg rozpoczyna się od otwarcia grzbietowo-bocznej ściany brzucha w środkowym punkcie między dolną granicą żeber a grzebieniem biodrowym oraz wykonania nacięcia o długości kilku milimetrów w poprzek do bocznej granicy mięśnia lędźwiowego. Należy zlokalizować jajniki w jamie brzusznej zwierzęcia. Następnie w aseptycznych warunkach fizycznie usuwa się jajniki z jamy brzusznej, podwiązując miejsce między jajnikiem

a macicą, aby zatamować krwawienie, i dokonuje się odłączenia jajnika przez nacięcie nad miejscem podwiązania w miejscu złączenia jajowodu i każdego rogu macicy. Po potwierdzeniu, że krwawienie nie nasila się, należy zamknąć ścianę brzucha przez założenie szwu oraz zamknąć skórę np. za pomocą klipsa lub szwu. Zwierzęta powinny odzyskać przytomność oraz powinien nastąpić regres masy macicy przynajmniej 14 dni przed ich wykorzystaniem.

Rysunek 2

Usunięcie i przygotowanie tkanek macicy w celu pomiaru masy



Zabieg rozpoczyna się od otwarcia ściany brzucha od spojenia łonowego. Następie z tylnej ściany brzucha usuwa się każdy jajnik, jeżeli są obecne, oraz róg macicy. Pęcherz moczowy i moczowody usuwa się z brzusznej i bocznej części macicy i pochwy. Następnie oddziela się zrost włóknisty między odbytnicą a pochwą do momentu, w którym można zidentyfikować miejsce złączenia ujścia pochwy i skóry krocza. Macicę i pochwę odłącza się od ciała przez wykonanie nacięcia ściany pochwy tuż nad miejscem złączenia ze skórą krocza, jak przedstawiono na powyższym rysunku. Macicę należy odłączyć od ściany ciała przez delikatne przecięcie krezki macicy w punkcie jej łączenia wzdłuż całej długości grzbietowo-bocznej części każdego rogu macicy. Po usunięciu macicy z ciała należy usunąć nadmiar tłuszczu i tkanki łącznej. Jeżeli jajniki są obecne, usuwa się je przy jajowodzie, unikając wypłynięcia płynu ze światła rogu macicy. W przypadku gdy zwierzęta poddano owariektomii, należy zbadać pozostałości pod kątem obecności tkanki jajnikowej. Pochwę usuwa się z macicy tuż pod szyjką, tak aby pozostawić szyjkę wraz z trzonem macicy, jak przedstawiono na powyższym rysunku. Następnie można zważyć macicę.

Dodatek 1

DEFINICJE:

Antyestrogenność oznacza zdolność substancji chemicznej do hamowania estradiolu 17-beta w organizmach ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Dzień narodzin oznacza dzień 0 po urodzeniu.

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Dawka jest ilością podawanej badanej substancji chemicznej. W odniesieniu do biologicznego testu wzrostu macicy dawka wyrażana jest w jednostkach wagowych badanej substancji chemicznej na jednostkę masy ciała badanego zwierzęcia doświadczalnego na dzień (np. mg/kg masy ciała/dobę).

Maksymalna tolerowana dawka (MTD) jest najwyższą ilością substancji chemicznej, która po wprowadzeniu do organizmu nie powoduje śmierci badanych zwierząt doświadczalnych (oznaczana jako LD_0) (IUPAC, 1993 r.).

Estrogenność oznacza zdolność substancji chemicznej do działania jak estradiol 17-beta w organizmach ssaków.

Dzień X po urodzeniu oznacza X-ty dzień życia po dniu narodzin.

Czułość oznacza odsetek wszystkich dodatnich/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki kategoryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności metody badawczej.

Swoistość oznacza odsetek wszystkich ujemnych/aktywnych substancji chemicznych prawidłowo sklasyfikowanych w badaniu. Jest to miara dokładności metody badawczej, która daje wyniki kategoryczne i stanowi parametr istotny do celów oceny przydatności metody badawczej.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę, badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Wzrost macicy jest pojęciem używanym do określania dodatniego wpływu na rozwój tkanek macicy.

Walidacja oznacza proces naukowy opracowany do określania wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej oraz do wykazywania jej wiarygodności i przydatności dla konkretnego celu.

Dodatek 2

Uwaga: Dokument sporządzony przez członków sekretariatu programu wytycznych dotyczących badań w oparciu o porozumienie osiągnięte na szóstym posiedzeniu grupy zadaniowej ds. badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Ramy koncepcyjne OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Poziom 1 Sortowanie i ustalenie substancji priorytetowych w oparciu o istniejące informacje	— Właściwości fizyczne i chemiczne, np. masa cząsteczkowa, reaktywność, lotność, biodegradowalność — Narażenie ludzi i narażenie środowiskowe, np. wielkość produkcji, uwalnianie, wzory używania — Zagrożenie, np. dostępne dane toksykologiczne	
Poziom 2 Testy *in vitro* dostarczające danych dotyczących mechanizmów działania	— Podobieństwo wiązań receptorowych ER, AR, TR — Aktywacja transkrypcji — Aromatazaisteroidogeneza *in vitro* — Rozpoznanie/wiązanie węglowodorowego receptora arylowego — QSAR	— Wysoka przepustowość badań wstępnych — Czynność tarczycy — Test witellogeniny (VTG) w hepatocytachu ryb — Inne (w stosownych przypadkach)
Poziom 3 Testy *in vivo* dostarczające danych dotyczących pojedynczych mechanizmów i efektów układu hormonalnego	— Test wzrostu macicy (pochodzenie estrogenne) — Test Hershbergera (pochodzenie androgenne) — Działanie hormonalne o podłożu niereceptorowym — Inne (np. tarczyca)	— Test witellogeniny (VTG) u ryb (pochodzenie estrogenne)
Poziom 4 Testy *in vivo* dostarczające danych dotyczących wielu mechanizmów i efektów układu hormonalnego	— Rozszerzona wytyczna OECD nr 407 (punkty końcowe w oparciu o mechanizmy układu hormonalnego) — Testy dojrzewania płciowego u samców i samic — Test dorosłych samców niepoddanych kastracji	— Badanie histopatologiczne gonad u ryb — Test metamorfozy żab
Poziom 5 Testy *in vivo* dostarczające danych dotyczących działań mechanizmów układu hormonalnego i innych mechanizmów	— Test jednego pokolenia (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 415)[1] — Test dwóch pokoleń (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 416)[1] — Badanie przesiewowe w zakresie rozrodczości (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 421)[1] — Łączone 28-dniowe badanie przesiewowe / badanie przesiewowe w zakresie rozrodczości (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 422)[1] [1] VMG mamm rozważy możliwe udoskonalenia	— Częściowe i pełne testy cykli życia ryb, ptaków, płazów i bezkręgowców (testy rozwojowe I testy w zakresie rozrodczości)

VMG mamm: zespół zarządzania walidacją ds. badań i oceny ssaków

UWAGI DO POWYŻSZYCH RAM:

Uwaga 1: Istnieje możliwość rozpoczynania i rezygnacji na wszystkich poziomach i zależy to od charakteru istniejącego zapotrzebowania na informacje do celów oceny zagrożenia i ryzyka.

Uwaga 2: Na poziomie 5 w badaniach z zakresu ekotoksykologii należy zawrzeć punkty końcowe, wskazujące mechanizmy niepożądanych skutków i potencjalne szkody dla populacji.

Uwaga 3: W przypadku gdy model multimodalny obejmuje kilka testów pojedynczych punktów końcowych, przedmiotowy model zastąpi stosowanie tych testów pojedynczych punktów końcowych.

Uwaga 4: Ocena każdej substancji chemicznej powinna opierać się na indywidualnych przypadkach, z uwzględnieniem wszystkich dostępnych informacji, mając na uwadze rolę poziomów powyższych ram koncepcyjnych.

Uwaga 5: Obecnienie należy traktować powyższych ram koncepcyjnych jako wytycznych obejmujących wszystkie kwestie. Poziomy 3, 4 i 5 obejmują testy, które są dostępne lub w odniesieniu do których trwa proces walidacji. W odniesieniu do tej ostatniej kwestii testy te zostały tymczasowo włączone. Po ich opracowaniu i przeprowadzeniu walidacji zostaną oficjalnie dodane do ram koncepcyjnych.

Uwaga 6: Nie należy uznawać, że poziom 5 zawiera wyłącznie badania ostateczne. Uznaje się, że badania uwzględnione na tym poziomie przyczyniają się do ogólnej oceny zagrożenia i ryzyka.

LITERATURA

(1) OECD (1998), »Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force«, 10–11 marca 1998 r., 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* nr 38, ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens, J.W., 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*, s. 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* nr 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*, s. 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* nr 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*, s. 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*, s. 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*, s. 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 [I^{125}]iododeoxyuridine«, *Endocrinology 113*, s. 582–587.

(11) Branham, W.S., Sheehan, D.M, Zehr, D.R., Ridlon, E., Nelson, C.J., (1985), »The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol«, *Endocrinology 117*, s. 2229–2237.

(12) Schlumpf, M., Berger, L., Cotton, B., Conscience-Egli, M., Durrer, S., Fleischmann, I., Haller, V., Maerkel, K., Lichtensteiger, W., (2001), »Estrogen active UV screens«, *SÖFW-J. 127*, s. 10–15.

(13) Zarrow, M.X., Lazo-Wasem, E.A., Shoger, R.L., (1953), »Estrogenic activity in a commercial animal ration« *Science 118*,s. 650–651.

(14) Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A., Saba, N., (1975), »The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake«, *Fd. Cosmet. Toxicol. 13*, s. 425–427.

(15) Boettger-Tong, H., Murphy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M., 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*, s. 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* nr 67.

(17) Degen, G.H., Janning, P., Diel, P., Bolt, H.M., (2002), »Estrogenic isoflavones in rodent diets«, *Toxicol. Lett. 128*, s. 145–157.

(18) Wade, M.G., 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*, s. 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*, s. 613–620.

(20) Thigpen, J.E., Haseman, J.K., Saunders, H.E., Setchell, K.D.R., Grant, M.F., Forsythe, D., (2003), »Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice«, *Comp. Med. 53*, s. 477–485.

(21) Ashby, J., Tinwell, H., Odum, J., Kimber, I., Brooks, A.N., Pate, I., Boyle, C.C., (2000), »Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development«, *J. Appl. Toxicol. 20*, s. 343–347.

(22) Thigpen, J.E., Lockear, J., Hasemanm, J., Saunders, H.E., Caviness, G., Grant, M.F., Forsythe, D.B., (2002), »Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays«, *Cancer Detect. Prev. 26*, s. 381–393.

(23) Thigpen, J.E., Li, L.-A., Richter, C.B., Lebetkin, E.H., Jameson, C.W., (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*, s. 596–601.

(24) OECD (2008), »Acute oral toxicity — up-and-down procedure«, *OECD Guideline for the testing of chemicals* nr 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* nr 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* nr 24, ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E. i Burn, J.H., (1935), »The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution«, *J. Physiol. 85*, s. 320–333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. i Koch, F.C., (1936), »The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis«, *Endocrinology 19*, s. 33– 41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. i Neal, B.H., (1996), »Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization«, *Fundam. Appl. Toxicol. 34*, s. 288–305.

(30) Jones, R.C. i Edgren, R.A., (1973), »The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat«, *Fertil. Steril. 24*, 284–291.

(31) OECD (1982), Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju — »Principles of Good Laboratory Practice«, ISBN 92-64-12367-9, Paryż.

(32) Dorfman, R.I., (1962), »Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization«, Nowy Jork, *Academic Press*.

(33) Thigpen, J.E., *et al.* (2004), »Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studiem«, *ILAR J 45(4)*, s. 401–416.

(34) Gray, L.E. i Ostby, J., (1998), »Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanizm«, *Toxicol Ind Health. 14 (1–2)*, s. 159–184.

(35) Booth, A.N., Bickoff, E.M. i Kohler, G.O., (1960), »Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products«, *Science 131*, s. 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 assai«, *J. Agric Food Chem. 52*, s. 1410–1414.

(37) OECD (2007), »Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment«, nr 71.

(38) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

B.55. TEST BIOLOGICZNY HERSHBERGERA NA SZCZURACH: KRÓTKOTERMINOWE BADANIE PRZESIEWOWE WŁAŚCIWOŚCI (ANTY)ANDROGENNYCH

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 441 (2009 r.). W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych na potrzeby badań przesiewowych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (1). Jednym z elementów tych działań było opracowanie wytycznych dotyczących testu biologicznego Hershbergera na szczurach. Po kilkudziesięciu latach stosowania tego testu przez przemysł farmaceutyczny został on po raz pierwszy znormalizowany w 1962 r. przez oficjalny komitet ekspertów jako narzędzie przesiewowe w odniesieniu do androgennych substancji chemicznych (2). W latach 2001–2007 test biologiczny Hershbergera na szczurach został objęty intensywnym programem walidacyjnym, w ramach którego sporządzono dokument przeglądowy kontekstu (23), dokument zawierający zestawienie szczegółowych metod (3), opracowano wytyczne dotyczące sekcji (21) oraz prowadzono intensywne wewnątrzlaboratoryjne i międzylaboratoryjne badania mające na celu pokazanie wiarygodności i odtwarzalności testu biologicznego. Wspomniane badania walidacyjne prowadzono na silnym androgenie referencyjnym (propionat testosteronu), dwóch silnych androgenach syntetycznych (octanie trenbolonu i metylotestosteronie), silnym antyandrogennym produkcie leczniczym (flutamidzie), silnym inhibitorze syntezy (finasterydzie) naturalnego androgenu (dihydrotestosteronu), kilku słabo antyandrogennych pestycydach (linuronie, winklozolinie, procymidonie, p,p' DDE), inhibitorze 5-alfa-reduktazy (finasterydzie) i dwóch znanych negatywnych substancjach chemicznych (dinitrofenolu i nonylofenolu) (4)(5)(6)(7)(8). Przedmiotowa metoda badawcza jest wynikiem wieloletniego doświadczenia związanego ze stosowaniem testu biologicznego i doświadczenia zdobytego w trakcie programu badań walidacyjnych i jego wyników.

2. Test biologiczny Hershbergera jest krótkoterminowym badaniem przesiewowym *in vivo*, w którym wykorzystuje się dodatkowe tkanki układu rozrodczego u samca. Test został opracowany w latach 30. i zmodyfikowany w latach 40. ubiegłego stulecia w taki sposób, aby uwzględniał mięśnie reagujące na androgeny w układzie rozrodczym samca (2)(9–15). W latach 60. ubiegłego stulecia oceniono ponad 700 potencjalnych androgenów, wykorzystując w tym celu unormowaną wersję protokołu (2)(14), a stosowanie testu zarówno w przypadku androgenów, jak i antyandrogenów uważano za metodę standardową także w latach 60. (2)(15). Obecnie stosowany test biologiczny oparty jest na zmianach masy pięciu zależnych od androgenów tkanek u wykastrowanego samca szczura w okresie wczesnego dojrzewania. W ramach testu ocenia się zdolność substancji chemicznej do wywołania aktywności biologicznej zgodnej z agonistami lub antagonistami androgenów lub inhibitorami 5-alfa-reduktazy. Do pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów, które są objęte tym testem, należą: dobrzuszny płat gruczołu krokowego, pęcherzyk nasienny (plus płyny i gruczoły koagulujące), mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, parzyste gruczoły Cowpera i żołądź. W przypadku wykastrowanego samca szczura w okresie wczesnego dojrzewania te wszystkie pięć tkanek reaguje na androgeny przyrostem masy całkowitej. Jeżeli te same tkanki stymuluje się w celu zwiększenia masy przez podawanie silnego androgenu referencyjnego, wszystkie pięć tkanek reaguje na antyandrogeny utratą masy całkowitej. Pierwotnym modelem testu biologicznego Hershbergera był chirurgicznie wykastrowany samiec w okresie wczesnego dojrzewania, co zostało poddane walidacji w fazach 1, 2 i 3 programu walidacyjnego Hershbergera.

3. Test biologiczny Hershbergera pełni rolę mechanistycznego badania przesiewowego *in vivo* w zakresie agonistów androgenów, antagonistów androgenów oraz inhibitorów 5-alfa-reduktazy i należy postrzegać test w kontekście »Ram koncepcyjnych OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego« (dodatek 2). W tym dokumencie test biologiczny Hershbergera został umieszczony na poziomie 3 jako test *in vivo* zapewniający dane o pojedynczym mechanizmie hormonalnym, tj. (anty)androgenności. Test ma być włączony do zestawu testów *in vitro* i *in vivo* mających na celu identyfikację substancji chemicznych, które mogą wchodzić w interakcję z układem hormonalnym, ostatecznie prowadząc do oceny zagrożenia i ryzyka dla zdrowia ludzkiego lub środowiska.

4. Z uwagi na kwestię dobrostanu zwierząt w związku z procedurą kastracji starano się, aby alternatywnym modelem do celów testu biologicznego Hershbergera został niekastrowany stymulowany samiec w okresie odsadzeniowym, aby uniknąć etapu kastracji. Przeprowadzono walidację metody badawczej stymulacji w okresie odsadzenia (24); jednak w trakcie badań walidacyjnych okazało się, że wersja testu biologicznego Hershbergera stosowanego w okresie odsadzenia nie pozwala w spójny sposób wykryć skutków działania słabych anty-androgenów na masę organów zależnych od androgenów przy badanych dawkach. W związku z tym nie została ona ujęta w tej metodzie badawczej. Uznając jednak, że korzystanie z tej metody może przynieść nie tylko korzyści dla dobrostanu zwierząt, ale umożliwi także uzyskanie informacji dotyczących innych rodzajów działań, jest ona dostępna w wytycznych OECD 115 (25).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

5. Agoniści i antagoniści androgenów działają jako ligandy receptorów androgenów oraz mogą odpowiednio aktywować lub hamować transkrypcję genów kontrolowaną przez receptory. Ponadto niektóre substancje chemiczne hamują przekształcanie testosteronu w silniejszy androgen naturalny dihydrotestosteron w niektórych docelowych tkankach androgenowych (inhibitory 5-alfa-reduktazy). Takie substancje chemiczne mogą powodować niepożądane zagrożenia dla zdrowia, w tym wpływ na reprodukcję i rozwój. W związku z tym istnieje regulacyjna potrzeba szybkiego dokonywania oceny i badania substancji chemicznej jako potencjalnego agonisty lub antagonisty androgenu lub inhibitora 5-alfa-reduktazy. Powinowactwo ligandu w odniesieniu do receptora androgenu zmierzone przez wiązanie z receptorami lub aktywację transkrypcji genów reporterowych *in vitro*, chociaż ma charakter informacyjny, nie stanowi jedynej determinanty potencjalnego zagrożenia. Pozostałe determinanty obejmują aktywację i dezaktywację metaboliczną w momencie dostania się substancji do organizmu, dystrybucję substancji chemicznych do tkanek docelowych i klirens tych substancji z organizmu. Stąd wynika potrzeba skontrolowania ewentualnego działania substancji chemicznej *in vivo* w odpowiednich warunkach i przy odpowiednim narażeniu. Ocena *in vivo* ma nieco mniejsze znaczenie, jeżeli znane są właściwości substancji chemicznej w odniesieniu do absorpcji, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji. Tkanki zależne od androgenów reagują na stymulację androgenami szybkim i gwałtownym wzrostem, w szczególności w przypadku wykastrowanych samców szczurów w okresie wczesnego dojrzewania. Gryzonie, w szczególności szczury, wykorzystuje się także powszechnie w badaniach toksyczności do celów charakteryzowania zagrożeń. W związku z tym wersja testu, w której wykorzystuje się wykastrowane szczury w okresie wczesnego dojrzewania i pięć docelowych tkanek w tym teście, jest odpowiednia do celów badań przesiewowych *in vivo* pod kątem agonistów i antagonistów androgenów oraz inhibitorów 5-alfa-reduktazy.

6. Powyższą metodę badawczą opracowano w oparciu o te protokoły wykorzystywane w badaniu walidacyjnym OECD, które okazały się wiarygodne i odtwarzalne w badaniach wewnątrzlaboratoryjnych i międzylaboratoryjnych (4)(5)(6)(7)(8). W metodzie tej przedstawia się zarówno procedury dotyczące androgenów, jak i antyandrogenów.

7. Chociaż różne laboratoria wprowadziły pewną zmianę w dawkach propionatu testosteronu stosowanych w celu wykrycia antyandrogenów w programie walidacyjnym OECD w odniesieniu do testu biologicznym Hershbergera (0,2 w porównaniu do 0,4 mg/kg/dobę, wstrzyknięcie podskórne), różnica pod względem zdolności wykrywania słabego lub silnego działania antyandrogennego między tymi dwoma zmienionymi protokołami była niewielka. Jest jednak oczywiste, że dawka propionatu testosteronu nie powinna być zbyt wysoka, żeby blokowała wpływ słabych antagonistów receptora androgenowego, lub tak niska, żeby tkanki androgenne wykazywały niewielką reakcję wzrostową nawet bez podania antyandrogenów.

8. Reakcja wzrostowa poszczególnych tkanek zależnych od androgenów nie jest wyłącznie pochodzenia androgennego, tj. masa określonych tkanek może ulegać zmianom pod wpływem substancji chemicznych innych niż agoniści androgenów. Reakcja wzrostowa różnych tkanek jednocześnie świadczy jednak o mechanizmie bardziej ukierunkowanym na androgeny. Na przykład duże dawki silnych estrogenów mogą powodować zwiększanie masy pęcherzyka nasiennego; pozostałe tkanki zależne od androgenów uwzględnione w teście nie reagują jednak w taki sam sposób. Antyandrogenne substancje chemiczne mogą działać jako antagoniści receptora androgenów lub jako inhibitory 5-alfa-reduktazy. Inhibitory 5-alfa-reduktazy mają zróżnicowane działanie, ponieważ przekształcenie w silniejszy w działaniu dihydrotestosteron różni się w zależności od tkanki. Antyandrogeny, które blokują 5-alfa-reduktazę, takie jak finasteryd, oddziałują w większym stopniu na dobrzuszny płat gruczołu krokowego niż na inne tkanki w porównaniu do silnego antagonisty receptora androgenowego, jakim jest flutamid. Ta różnica w reakcjach tkanek może być wykorzystywana do odróżnienia trybów działania receptora androgenowego i 5-alfa-reduktazy. Receptor androgenowy jest ponadto ewolucyjnie powiązany z receptorem innych hormonów steroidowych i niektórych innych hormonów, jeżeli jest podawany w dużych, suprafizjologicznych dawkach, może wiązać i antagonizować działanie wzrostowe propionatu testosteronu (13). Ponadto jest również prawdopodobne, że zwiększony metabolizm steroidów i konsekwentne obniżanie poziomu testosteronu w surowicy mogłoby ograniczyć wzrost tkanek zależnych od androgenów. W związku z tym każdy wynik dodatni w teście biologicznym Hershbergera należy zazwyczaj oceniać, stosując zasadę wagi dowodu, w tym testy *in vitro*, takie jak testy wiążące receptor androgenowy i receptor estrogenowy oraz odpowiadające im testy aktywacji transkrypcyjnej, lub inne testy *in vivo*, które polegają na badaniu podobnych tkanek docelowych zależnych od androgenów, takie jak test młodego samca w okresie dojrzewania, 15-dniowy test niekastrowanego samca lub 28-dniowe lub 90-dniowe badania toksyczności wywołanej powtarzanym dawkowaniem.

9. Doświadczenie wskazuje, że androgeny ksenobiotyczne występują rzadziej niż antyandrogeny ksenobiotyczne. Przewiduje się zatem, że test biologiczny Hershbergera będzie wykorzystywany najczęściej do badania przesiewowego antyandrogenów. Procedura przeprowadzania testów na androgeny mogłaby jednak być zalecania w odniesieniu do substancji steroidowych lub sterydopodobnych, lub substancji, w przypadku których wskazanie możliwego działania androgennego zostało oparte na metodach poziomu 1 lub 2 ram koncepcyjnych (dodatek 2). Podobnie niepożądane skutki związane z (anty)androgennymi profilami można obserwować w testach poziomu 5, co prowadzi do konieczności oceny, czy substancja chemiczna działa na zasadzie hormonu.

10. Uznano, że wszelkie procedury, w których wykorzystuje się zwierzęta, powinny być zgodne z lokalnymi normami w zakresie utrzymywania zwierząt; przedstawione poniżej opisy dotyczące utrzymywania i traktowania zwierząt stanowią minimalne standardy wykonywania badań i zostaną zastąpione przez lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (26). OECD udziela dalszych wskazówek dotyczących humanitarnego traktowania zwierząt (17).

11. Podobnie jak w przypadku każdego testu biologicznego, w ramach którego wykorzystuje się zwierzęta doświadczalne, należy starannie przemyśleć konieczność przeprowadzenia tego badania. Zasadniczo można wyróżnić dwa powody takiej decyzji:

— wysokie prawdopodobieństwo narażenia (poziom 1 ram koncepcyjnych) lub wskazania w odniesieniu do (anty)androgenności w testach *in vitro* (poziom 2) wspierających badania dotyczące tego, czy takie działania mogą wystąpić *in vivo*,

— działania zgodne z (anty)androgennością na poziomie 4 lub 5 badań *in vivo* wspierających badania szczegółowego sposobu działania, np. w celu określenia, czy działania były związane z mechanizmem (anty)androgennym.

12. Definicje stosowane w tej metodzie badawczej przedstawiono w dodatku 1.

ZASADA BADANIA

13. Czułość testu biologicznego Hershbergera zostaje osiągnięta dzięki wykorzystaniu samców z minimalną endogenną produkcją androgenów. Cel ten osiąga się dzięki wykorzystaniu wykastrowanych samców, pod warunkiem że zapewnia się odpowiedni czas po kastracji na powrót tkanek docelowych do minimalnej i jednakowej masy podstawowej. Zatem w przypadku badań przesiewowych prowadzonych pod kątem potencjalnego działania androgennego istnieją niskie endogenne poziomy androgenów w krwioobiegu, oś podwzgórze-przysadka-gonady nie jest w stanie kompensować za pośrednictwem mechanizmów sprzężenia zwrotnego, zdolność tkanek do reakcji ulega maksymalnemu zwiększeniu, a zmienność początkowej masy tkanek maleje do minimum. W przypadku badań przesiewowych pod kątem potencjalnego działania antyandrogennego można uzyskać bardziej spójny przyrost masy tkanek, jeżeli tkanki stymuluje się androgenem referencyjnym. W związku z powyższym test biologiczny Hershbergera wymaga wyłącznie 6 zwierząt na grupę dawkowania, natomiast w przypadku innych badań z niekastrowanymi samcami w okresie dojrzewania lub samcami dorosłymi zaleca się wykorzystywanie 15 samców na grupę dawkowania.

14. Kastrację samców szczurów w okresie wczesnego dojrzewania należy wykonać w sposób właściwy, stosując zatwierdzone znieczulenie i technikę aseptyczną. Należy podać środki przeciwbólowe w pierwszych kilku dniach po zabiegu w celu wyeliminowania dyskomfortu pozabiegowego. Kastracja zwiększa precyzję badania w zakresie wykrywania słabych androgenów i antyandrogenów przez eliminowanie kompensacyjnych hormonalnych mechanizmów sprzężenia zwrotnego obecnych u niekastrowanego zwierzęcia, które mogą osłabiać działanie podawanych androgenów i antyandrogenów, oraz przez eliminowanie dużej międzyosobniczej zmienności w poziomach testosteronu w surowicy. Kastracja ogranicza zatem liczbę zwierząt wymaganych do badań przesiewowych w zakresie działania tych hormonów.

15. W przypadku badań przesiewowych pod kątem potencjalnego działania androgennego badana substancja chemiczna podawana jest codziennie przez sondę drogą doustną lub wstrzyknięcie podskórne przez okres dziesięciu kolejnych dni. Badane substancje chemiczne podaje się przynajmniej dwóm badanym grupom zwierząt doświadczalnych, wykorzystując jedną dawkę na grupę. Zwierzęta poddaje się sekcji po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. Istotny statystycznie wzrost masy jednego lub większej liczby organów docelowych w grupie otrzymującej badaną substancję w stosunku do grupy kontrolnej nośnika wskazuje na działanie androgenne badanej substancji chemicznej (zob. pkt 60). Androgeny, jak trenbolon, które nie mogą ulec przemianie pod wpływem 5-alfa-reduktazy, silniej oddziałują na mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty oraz na żołądź w porównaniu z propionatem testosteronu, jednak zwiększony przyrost powinien pojawić się w przypadku wszystkich tkanek.

16. W przypadku badań przesiewowych pod kątem potencjalnego działania antyandrogennego badaną substancję chemiczną podaje się codziennie przez sondę drogą doustną lub wstrzyknięcie podskórne przez okres dziesięciu kolejnych dni wraz z codziennymi dawkami propionatu testosteronu (0,2 lub 0,4 mg/kg/dobę) wstrzykiwanymi podskórnie. W programie walidacji stwierdzono, że możliwe jest podawanie propionatu testosteronu w dawce 0,2 lub 0,4 mg/kg/dobę, ponieważ obie dawki są skuteczne w wykrywaniu antyandrogenów i w związku z tym

należy wybrać tylko jedną dawkę do stosowania w badaniu. Stopniowane dawki badanej substancji chemicznej podaje się przynajmniej trzem badanym grupom zwierząt doświadczalnych, wykorzystując jedną dawkę na grupę. Zwierzęta poddaje się sekcji po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. Istotny statystycznie spadek masy jednego lub większej liczby organów docelowych w grupach, którym podawano badaną substancję chemiczną i propionat testosteronu, w porównaniu z grupą kontrolną, której podawano wyłącznie propionat testosteronu, wskazuje na ewentualne dodatnie antyandrogenne działanie badanej substancji (zob. pkt 61).

OPIS METODY BADAWCZEJ

Wybór gatunków i szczepu

17. Do testu biologicznego Hershbergera systematycznie wykorzystywano szczury od lat 30. ubiegłego stulecia. Chociaż z biologicznego punktu widzenia zarówno u szczura, jak i myszy prawdopodobnie wystąpiłyby podobne reakcje, to jednak, opierając się na 70 latach doświadczenia z modelem szczura, właśnie to zwierzę stanowi gatunek preferowany do celów testu biologicznego Hershbergera. Należy dodać, że skoro dane uzyskane w teście Hershbergera mogą stanowić wstęp do długoterminowych badań międzypokoleniowych, umożliwia to wykorzystanie zwierząt pochodzących z tego samego gatunku, szczepu i źródła w obu badaniach.

18. W niniejszym protokole zezwala się laboratoriom na wybór do badania szczepu szczurów, który powinien zasadniczo być jednym z historycznie używanych przez uczestniczące laboratorium. Do badań wykorzystuje się powszechnie stosowane laboratoryjne szczepy szczurów; nie należy jednak wykorzystywać szczepów, które dojrzewają znacznie później niż w 42. dniu życia, ponieważ kastracja takich samców w 42. dniu życia mogłaby uniemożliwić pomiar masy żołędzia, co można wykonać jedynie po oddzieleniu napletka od trzonu prącia. Nie należy zatem stosować szczurów otrzymanych ze szczepu Fisher 344 z wyjątkiem pojedynczych przypadków. Szczury szczepu Fisher 344 odznaczają się innym czasem trwania etapów rozwoju płciowego w porównaniu z innymi stosowanymi częściej szczepami, jak szczepy Sprague Dawley lub Wistar (16). Jeżeli wykorzystuje się jednak taki szczep, laboratorium powinno zapewnić kastrację na nieco późniejszym etapie rozwoju i powinno być w stanie przedstawić czułość zastosowanego szczepu. Laboratorium powinno wyraźnie wskazać powody podjęcia decyzji o wyborze danego szczepu szczurów. W przypadku gdy badanie przesiewowe przeprowadza się jako badanie wstępne poprzedzające badanie toksyczności doustnej wywołanej powtarzanym dawkowaniem, badanie reprodukcyjne i rozwojowe lub badanie długoterminowe, należy wykorzystywać zwierzęta z tego samego szczepu i źródła we wszystkich badaniach.

Warunki trzymania i żywienia

19. Wszystkie procedury powinny być zgodne ze wszystkimi lokalnymi normami opieki nad zwierzętami laboratoryjnymi. Opisy dotyczące opieki nad zwierzętami i ich traktowania stanowią normy minimalne i zostaną zastąpione przez bardziej rygorystyczne lokalne przepisy, takie jak dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (26). Temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (w przybliżeniu z tolerancją ± 3 °C). Wilgotność względna poza okresem czyszczenia pomieszczenia powinna wynosić co najmniej 30 % i nie przekraczać 70 %. Wilgotność względną należy docelowo utrzymywać w granicach 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności.

20. Zaleca się trzymanie zwierząt w grupach, a nie w odosobnieniu, ze względu na młody wiek zwierząt i fakt, że szczury są zwierzętami społecznymi. Trzymanie w klatce dwóch lub trzech zwierząt zapobiega ich stłoczeniu i wystąpieniu związanego z tym stresu, co mogłoby utrudniać kontrolę hormonalną rozwoju dodatkowej tkanki płciowej. Klatki należy dokładnie czyścić, aby pozbyć się ewentualnych zanieczyszczeń, i ustawiać je w taki sposób, aby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. Klatki we właściwym rozmiarze (~2 000 centymetrów kwadratowych) będą zapobiegać zatłoczeniu.

21. Każde zwierzę należy indywidualnie oznakować w celach identyfikacyjnych (np. znak na uszach lub marker), stosując w tym celu humanitarną metodę. Metodę identyfikacji należy odnotować.

22. Należy zapewnić paszę laboratoryjną i wodę pitną *ad libitum*. Laboratoria wykonujące test biologiczny Hershbergera powinny używać paszy laboratoryjnej stosowanej zazwyczaj w ich pracy badawczej nad substancjami chemicznymi. W ramach badania walidacyjnego testu biologicznego nie zaobserwowano żadnych skutków ani zmienności, które można powiązać z paszą. Stosowana pasza laboratoryjna zostanie odnotowana i jej próbkę należy zachować na potrzeby przyszłej analizy.

Kryteria wykonywania badań w przypadku masy narządów zależnych od androgenów

23. Podczas badania walidacyjnego nie znaleziono dowodów, że spadek masy ciała wpływa na wzrosty lub spadki wielkości masy tkanek w odniesieniu do tkanek docelowych (tj. tych, które należy uwzględnić w niniejszym badaniu).

24. Wśród różnych szczepów szczurów stosowanych z powodzeniem w programie walidacyjnym masy narządów zależnych od androgenów są większe u cięższych szczepów szczurów niż u szczepów lżejszych. W związku z tym kryteria wykonywania testu biologicznego Hershbergera nie obejmują bezwzględnych przewidywanych mas organów w przypadku kontroli dodatnich i ujemnych.

25. Ponieważ współczynnik zmienności w odniesieniu do tkanki cechuje stosunek odwrotnie proporcjonalny do mocy testu statystycznego, kryteria wykonywania testu biologicznego Hershbergera oparte są na maksymalnych wartościach współczynnika zmienności w przypadku każdej tkanki (tabela 1). Współczynniki zmienności wynikają z badań walidacyjnych OECD. W przypadku ujemnych wyników laboratoria powinny zbadać współczynniki zmienności w grupie kontrolnej i grupie otrzymującej wysoką dawkę w celu stwierdzenia, czy przekroczono maksymalny współczynnik zmienności w odniesieniu do kryteriów wykonywania.

26. Należy powtórzyć badanie w następujących przypadkach: 1) gdy trzy lub większa liczba spośród dziesięciu możliwych indywidualnych współczynników zmienności w grupie kontrolnej i grupie otrzymującej wysoką dawkę przekraczają maksymalne wartości przewidziane dla badań pod kątem agonistów i antagonistów w tabeli 1 oraz 2) co najmniej dwie tkanki docelowe są marginalnie nieistotne, tj. wartości r wynoszą 0,05–0,10.

Tabela 1

Maksymalne dopuszczalne współczynniki zmienności określone dla docelowych dodatkowych gruczołów płciowych w przypadku modelu kastrowanego w badaniu walidacyjnym OECD [1]

Tkanka	Działanie antyandrogenne	Działanie androgenne
Pęcherzyki nasienne	40 %	40 %
Dobrzuszny płat gruczołu krokowego	40 %	45 %
Mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty	20 %	30 %
Gruczoły Cowpera	35 %	55 %
Żołądź	17 %	22 %

PROCEDURA

Przestrzeganie przepisów i weryfikacja laboratorium

27. W przeciwieństwie do biologicznego testu wzrostu macicy (rozdział B.54 niniejszego załącznika) przedstawienie kompetencji laboratorium przed rozpoczęciem badań nie jest konieczne do przeprowadzenia testu Hershbergera, ponieważ jednoczesne kontrole dodatnie (propionat testosteronu i flutamid) i kontrole ujemne są prowadzone jako integralna część badania.

Liczba i stan zwierząt

28. Każda grupa badana i grupa kontrolna powinna składać się z co najmniej 6 zwierząt. Ma to zastosowanie zarówno do protokołów związanych z działaniem androgennym, jak i antyandrogennym.

Kastracja

29. Po odebraniu zwierząt należy przewidzieć kilkudniowy wstępny okres aklimatyzacji, aby zapewnić zwierzętom dobry stan zdrowia i rozwój. Ponieważ w przypadku zwierząt wykastrowanych przed 42. dniem życia (42. dniem po urodzeniu) może nie pojawiać się oddzielenie napletka, zwierzęta należy kastrować w 42. dniu po urodzeniu lub później, ale nie wcześniej. Zwierzęta kastruje się w znieczuleniu przez nacięcie w mosznie i usunięcie obu jąder i najądrza, a następnie podwiązanie naczyń krwionośnych i przewodów nasiennych. Po potwierdzeniu, że nie występuje krwawienie, należy zamknąć moszną za pomocą szwu lub klipsu chirurgicznego. Zwierzętom należy podawać środki przeciwbólowe przez pierwszych kilka dni po zabiegu w celu złagodzenia jakiegokolwiek dyskomfortu pozabiegowego. Jeżeli kastrowane zwierzęta nabywa się od dostawcy zwierząt, informacje na temat wieku zwierząt i etapu dojrzałości płciowej powinny zostać dostarczone przez dostawcę.

[1] Progowy współczynnik zmienności w odniesieniu do danej tkanki określono na podstawie wykresu wartości współczynnika zmienności, uporządkowanych sekwencyjnie od najniższych do najwyższych, jednolicie w odniesieniu do wszystkich eksperymentów w badaniu walidacyjnym przy użyciu konkretnego modelu (agonistycznego lub antagonistycznego). Graniczny współczynnik zmienności odczytano z punktu, w którym przyrosty między następnymi najwyższymi współczynnikami zmienności w serii są znacznie większe niż kilka poprzedzających współczynników zmienności — wartość graniczna. Należy zauważyć, że chociaż w ramach tej analizy zidentyfikowano względnie wiarygodne wartości graniczne w odniesieniu do modelu antagonistycznego testu, krzywe współczynnika zmienności dotyczące testu agonistycznego wykazały bardziej jednolity wzrost, przez co wyznaczenie progowego współczynnika zmienności tą metodą było poniekąd arbitralne.

Aklimatyzacja po kastracji

30. Zwierzęta powinny nadal aklimatyzować się w warunkach laboratoryjnych w celu umożliwienia regresu masy tkanek docelowych przez co najmniej 7 dni po kastracji. Zwierzęta należy obserwować codziennie, a każde zwierzę z oznakami choroby lub fizycznych anomalii należy wyłączać z badań. Poddawanie działaniu substancji poprzez rozpoczęcie dawkowania (w trakcie badań) można zatem rozpocząć się dopiero w 49. dniu po urodzeniu, ale nie później niż w 60. dniu po urodzeniu. Wiek w momencie przeprowadzania sekcji nie powinien przekraczać 70. dnia od urodzenia. Ta elastyczność umożliwia pracownikom laboratorium zaplanowanie prac eksperymentalnych w sposób efektywny.

Masa ciała i randomizacja grupy

31. Różnice w indywidualnej masie ciała są źródłem zmienności w masie tkanek zarówno w obrębie grup zwierząt, jak i między tymi grupami. Zwiększająca się zmienność masy tkanek skutkuje zwiększonym współczynnikiem zmienności i zmniejszoną statystyczną mocą testu (określaną czasami jako czułość testu). W związku z tym zróżnicowanie masy ciała należy kontrolować zarówno eksperymentalnie, jak i statystycznie.

32. Kontrola eksperymentalna obejmuje tworzenie niewielkich zróżnicowań masy ciała w obrębie badanych grup i między tymi grupami. Po pierwsze, należy unikać wykorzystywania niezwykle małych lub dużych zwierząt i nie włączać ich do badania kohortowego. W momencie rozpoczęcia badań zróżnicowanie masy wykorzystywanych zwierząt nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy (np. 175 g ± 35 g w przypadku wykastrowanych szczurów w okresie wczesnego dojrzewania). Po drugie, zwierzęta należy przydzielić do grup (zarówno kontrolnych, jak i badanych) zgodnie z randomizowanym rozkładem masy w taki sposób, aby średnia masa ciała danej grupy nie odbiegała statystycznie od pozostałych grup. Należy odnotować procedurę randomizacji blokowej.

33. Ponieważ toksyczność może powodować zmniejszenie masy ciała w obrębie grup badanych w stosunku do grupy kontrolnej, masa ciała w pierwszym dniu podawania badanej substancji chemicznej mogłaby zostać wykorzystana jako statystyczna zmienna towarzysząca, a nie masa ciała ustalona przy sekcji.

Dawkowanie

34. W celu stwierdzenia, czy badana substancja chemiczna może mieć działanie androgenne *in vivo*, zazwyczaj wystarczają dwie grupy dawkowania badanej substancji chemicznej plus kontrola dodatnia i kontrola nośnika (ujemna) (zob. pkt 43), dlatego też taki projekt badania jest preferowany ze względu dobrostan zwierząt. Jeżeli celem jest uzyskanie krzywej dawka-odpowiedź lub ekstrapolowanie do mniejszych dawek, potrzebne są co najmniej 3 grupy dawkowania. Jeżeli wymagane są informacje wykraczające poza kwestię działania androgennego (takie jak oszacowanie siły działania), należy rozważyć zastosowanie innego schematu dawkowania. W celu przeprowadzenia badania w zakresie antyandrogenów badaną substancję chemiczną podaje się razem z agonistą androgenu referencyjnego. Należy wykorzystać co najmniej 3 grupy badane objęte różnymi dawkami badanej substancji chemicznej oraz kontrolę dodatnią i ujemną (zob. pkt 44). Z wyjątkiem podawania badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej należy traktować w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej używa się nośnika, grupa kontrolna powinna otrzymać największą objętość nośnika zastosowaną w przypadku grupy badanej.

35. Wszystkie dawki należy proponować i dobierać z uwzględnieniem wszelkich istniejących danych dotyczących toksyczności i danych (toksyko)kinetycznych dostępnych w odniesieniu do substancji badanej lub materiałów pokrewnych. Stosując najwyższą dawkę, należy, po pierwsze, uwzględnić LD_{50} lub informacje dotyczące ostrej toksyczności w celu uniknięcia śmierci, poważnego cierpienia lub stresu u zwierząt (17)(18)(19)(20), a w drugiej kolejności uwzględnić dostępne informacje dotyczące dawek stosowanych w badaniach toksyczności podprzewlekłej i przewlekłej. Zasadniczo najwyższa dawka nie powinna powodować spadku ostatecznej masy ciała zwierząt większego niż 10 % masy grupy kontrolnej. Najwyższa dawka powinna być 1) najwyższą dawką, która zapewnia zwierzętom przeżycie i która nie wiąże się ze znaczną toksycznością lub stresem u zwierząt po 10 kolejnych dniach podawania dawki wynoszącej maksymalne 1000 mg/kg/dobę (zob. pkt 36) lub 2) dawką wywołującą działania (anty)androgenne, w zależności od tego, która z nich jest niższa. W ramach badań przesiewowych dopuszcza się duże odstępy pomiędzy kolejnym dawkowaniem, np. pół jednostki logarytmicznej (odpowiadających sekwencji dawkowania równej 3,2) lub nawet jedną jednostkę logarytmiczną. W przypadku braku dostępności odpowiednich danych można przeprowadzić badanie ustalające zakres dawkowania (zob. pkt 37), aby wspomóc określenie dawek, które należy stosować.

Poziom dawki granicznej

36. Jeżeli badanie przy dawce równej 1 000 mg/kg masy ciała/dobę i dawce niższej z wykorzystaniem procedur opisanych w przypadku tego badania nie jest w stanie wywołać istotnej statystycznie zmiany masy narządów rozrodczych, wówczas zastosowanie dodatkowych dawek można uznać za zbędne. Dawka graniczna ma zastosowanie z wyjątkiem przypadków, w których dane dotyczące narażenia ludzi wskazują na potrzebę zastosowania wyższej dawki.

Uwagi dotyczące ustalania zakresu dawkowania

37. W razie potrzeby można przeprowadzić wstępne badanie ustalające zakres dawkowania, wykorzystując kilka zwierząt w celu doboru odpowiednich grup dawkowania [stosując metody badania ostrej toksyczności (rozdział B.1 bis, B.1 ter niniejszego załącznika (27), OECD TG 425 (19))]. Celem testu biologicznego Hershbergera jest dobór dawek, które zapewniają zwierzętom przeżycie i które nie wiążą się ze znaczną toksycznością lub stresem u zwierząt po dziesięciu kolejnych dniach podawania substancji chemicznej w wysokości równej dawce granicznej wynoszącej 1 000 mg/kg/dobę, jak wskazano w pkt 35 i 36. W związku z tym można skorzystać z dokumentu zawierającego wytyczne OECD (17), w którym przedstawiono objawy kliniczne wskazujące na toksyczność lub stres u zwierząt. Jeżeli jest to wykonalne w ramach przedmiotowego badania ustalającego zakres dawkowania, po dziesięciu dniach podawania substancji tkanki docelowe można wyciąć i zważyć po upływie około 24 godzin od podania ostatniej dawki. Dane te można następnie wykorzystać w celu ułatwienia doboru dawek w badaniu głównym.

Substancje chemiczne odniesienia i nośnik

38. Agonistą androgenu odniesienia powinien być propionat testosteronu, nr CAS 57-82-5. Dawkowanie propionatu testosteronu odniesienia może wynosić 0,2 mg/kg masy ciała/dobę lub 0,4 mg/kg masy ciała/dobę. Antagonistą androgenu referencyjnego powinien być flutamid, nr CAS 1311-84-7. Dawka referencyjna flutamidu powinna wynosić 3 mg/kg masy ciała/dobę i powinna być podawana razem z dawką referencyjną propionatu testosteronu.

39. Zaleca się, na ile to możliwe, rozważenie użycia w pierwszej kolejności roztworu wodnego/zawiesiny wodnej. Ponieważ jednak wiele ligandów androgenów lub ich prekursorów metabolicznych wykazuje zazwyczaj właściwości hydrofobowe, najpowszechniejszym podejściem jest użycie roztworu/zawiesiny w oleju (np. kukurydzianym, z orzechów arachidowych, oleju sezamowym lub w oliwie z oliwek). Badane substancje chemiczne można rozpuścić w minimalnej ilości etanolu 95 % lub w innych odpowiednich rozpuszczalnikach i rozcieńczyć w badanym nośniku do uzyskania końcowych stężeń roboczych. Należy znać właściwości toksyczne rozpuszczalnika i zbadać je w oddzielnej grupie kontrolnej rozpuszczalnika. Jeżeli badana substancja chemiczna zostanie uznana za stabilną, można zastosować delikatne podgrzewanie i energiczne mieszanie w celu łatwiejszego rozpuszczenia badanej substancji chemicznej. Należy oznaczyć stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku. Jeżeli badana substancja chemiczna jest stabilna w trakcie badań, wówczas można przygotować jedną początkową podwielokrotność badanej substancji i przygotowywać codziennie określone rozcieńczenia dawek, zachowując ostrożność dla uniknięcia zanieczyszczenia i zepsucia się próbek.

Podawanie dawek

40. Propionat testosteronu należy podawać przez wstrzyknięcie podskórne, a flutamid przez sondę drogą doustną.

41. Substancję chemiczną podaje się drogą doustną przez sondę lub przez podskórne wstrzyknięcie. Przy wyborze drogi podawania należy kierować się dobrostanem zwierząt oraz uwzględniać fizykochemiczne właściwości badanej substancji chemicznej. Ponadto przed rozpoczęciem intensywnych, długoterminowych badań należy wziąć pod uwagę aspekty toksykologiczne, takie jak związek z drogą narażenia na działanie substancji u ludzi (np. droga doustna przez sondę jako odpowiednik spożycia substancji, podskórne wstrzyknięcie jako odpowiednik inhalacji lub wchłaniania przez skórę) oraz istniejące informacje toksykologiczne i dane dotyczące metabolizmu i kinetyki (np. konieczność unikania efektu pierwszego przejścia, zwiększona efektywność przez podanie substancji określoną drogą), jeżeli uzyska się dodanie wyniki na skutek wstrzyknięcia.

42. Zwierzętom należy dawkować substancje w taki sam sposób i w równych odstępach czasu przez dziesięć kolejnych dni w przybliżeniu w 24-godzinnych odstępach czasu. Należy codziennie dostosowywać wielkość dawki na podstawie towarzyszących dawkowaniu codziennych pomiarów masy ciała. Objętość dawki i czas podania należy odnotowywać każdego dnia, w którym następuje narażenie na działanie substancji. Należy zachować szczególną ostrożność, aby nie przekroczyć dawki maksymalnej określonej w pkt 35 w celu umożliwienia wiarygodnej interpretacji danych. W związku z tym należy dokonać gruntownej oceny spadku masy ciała, objawów klinicznych i innych ustaleń. Do podawania drogą doustną należy użyć sondy dożołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Maksymalna objętość płynu, jaką można podać jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Należy przestrzegać lokalnych wytycznych dotyczących opieki nad zwierzętami, jednak przedmiotowa objętość nie powinna przekroczyć 5 ml/kg masy ciała, z wyjątkiem roztworów wodnych, w przypadku których można stosować objętość wynoszącą 10 ml/kg masy ciała. W przypadku wstrzyknięć podskórnych dawki należy podawać w okolice łopatki na grzbiecie lub w okolice lędźwi przy użyciu sterylnej igły (np. o rozmiarze 23 lub 25 G) lub strzykawki tuberkulinowej. Golenie miejsca wstrzyknięcia nie jest obowiązkowe. Należy odnotować wszelkie straty, wycieki w miejscu wstrzyknięcia lub przypadki niepełnego podania dawki. Całkowita objętość wstrzykiwanej dawki przypadająca na jednego szczura na dobę nie powinna przekraczać 0,5 ml/kg masy ciała.

Procedury szczegółowe w odniesieniu do agonistów androgenu

43. W przypadku badania w zakresie agonistów androgenów grupa nośnika stanowi kontrolę ujemną, a grupa objęta podawaniem propionatu testosteronu stanowi kontrolę dodatnią. Aktywność biologiczną zgodną z agonistami androgenów bada się przez podawanie badanym grupom badanej substancji chemicznej w określonych dawkach przez 10 kolejnych dni. Masy pięciu płciowych gruczołów dodatkowych z grup badanej substancji chemicznej porównuje się z grupą nośnika w zakresie istotnych statystycznie przyrostów wagi.

Procedury szczegółowe w odniesieniu do antagonistów androgenu i inhibitorów 5-alfa-reduktazy

44. W przypadku badania w zakresie antagonistów androgenu i inhibitorów 5-alfa-reduktazy grupa objęta podawaniem propionatu testosteronu stanowi kontrolę ujemną, a grupa, której podaje się jednocześnie dawki referencyjne propionatu testosteronu i flutamidu, stanowi kontrolę dodatnią. Aktywność biologiczną zgodną z antagonistami androgenu i inhibitorami 5-alfa-reduktazy bada się, podając dawkę referencyjną propionatu testosteronu i badanej substancji chemicznej przez 10 kolejnych dni. Masy pięciu płciowych gruczołów dodatkowych z grupy objętej podawaniem propionatu testosteronu i grupy badanej substancji chemicznej porównuje się pod względem istotnych statystycznie spadków masy z grupą odniesienia, która otrzymywała wyłącznie propionat testosteronu.

OBSERWACJE

Obserwacje kliniczne

45. Ogólne obserwacje kliniczne należy przeprowadzać przynajmniej raz dziennie, a przypadku zaobserwowania oznak toksyczności ze zwiększoną częstotliwością. Najlepiej jest prowadzić obserwacje o tych samych godzinach doby z uwzględnieniem okresu oczekiwanych skutków szczytowych po dawkowaniu. Należy przeprowadzać obserwacje zwierząt pod kątem śmiertelności, zachorowalności i ogólnych objawów klinicznych, takich jak zmiany w zachowaniu, skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, występowanie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenic, nietypowy rytm oddychania).

46. Każde zwierzę, które poniosło śmierć, należy usunąć i zutylizować bez dalszej analizy danych. Każdą śmierć zwierzęcia poprzedzającą sekcję należy uwzględnić w dokumentacji dotyczącej badania wraz z podaniem wszelkich widocznych przyczyn śmierci. Każde zwierzę w stanie agonalnym należy uśmiercić w sposób humanitarny. Każde zwierzę w stanie agonalnym i w konsekwencji poddane eutanazji należy uwzględnić w dokumentacji dotyczącej badania wraz z podaniem widocznych przyczyn śmierci.

Masa ciała i spożycie pokarmu

47. Wszystkie zwierzęta należy codziennie ważyć z dokładnością do 0,1 g, zaczynając tuż przed rozpoczęciem dawkowania, tj. w momencie przydzielania zwierząt do grup. Opcjonalnie można mierzyć ilości spożywanego pokarmu przypadające na każdą klatkę w trakcie okresu dawkowania, ważąc w tym celu karmniki. Wyniki dotyczące spożycia pokarmu należy wyrażać w gramach na szczura na dobę.

Sekcja oraz pomiar masy tkanek i narządów

48. Po około 24 godzinach od ostatniego podania badanej substancji chemicznej szczury należy poddać eutanazji i wykrwawić zgodnie ze standardowymi procedurami stosowanymi w laboratorium prowadzącym, a następnie przeprowadzić sekcję. W sprawozdaniu sporządzonym przez laboratorium należy odnotować metodę zastosowaną do humanitarnego uśmiercenia.

49. Najlepiej jest dokonywać sekcji na losowo wybranych zwierzętach z grup w celu uniknięcia progresji rosnącej lub malejącej w ramach grup dawkowania, co mogłoby wpłynąć na dane. Wszelkie ustalenia dokonane w trakcie sekcji, tj. zmiany patologiczne/widoczne uszkodzenia należy odnotować i zarejestrować.

50. Należy zważyć pięć tkanek zależnych od androgenów (dobrzuszny płat gruczołu krokowego, pęcherzyk nasienny, mięsień-dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, gruczoły Cowpera, żołądź). Tkanki te należy wyciąć, ostrożnie usunąć nadmiar przylegającej tkanki i tłuszczu i określić natychmiast ich masę w stanie świeżym (nieutrwalonym). Z każdą tkanką należy obchodzić się z zachowaniem szczególnej ostrożności, aby uniknąć utraty płynów i osuszenia, co może być źródłem znacznych błędów i zmienności w wyniku spadku odnotowanych mas. Szereg tkanek może być bardzo małych lub ich wycięcie może sprawiać trudności, co stanie się przyczyną zmienności. W związku z tym ważne jest, aby osoby przeprowadzające sekcję płciowych gruczołów

dodatkowych zapoznały się ze standardowymi procedurami przeprowadzania sekcji tych tkanek. Podręcznik dotyczący standardowej procedury operacyjnej dostępny jest na stronach internetowych OECD (21). Dokładne przeszkolenie zgodnie z wytycznymi standardowej procedury operacyjnej zminimalizuje potencjalne źródło powstania zmienności w badaniu. Najlepiej byłoby, gdyby za sekcję danej tkanki odpowiadał ten sam prosektor w celu wyeliminowania różnic międzyosobniczych w trakcie przetwarzania tkanek. Jeżeli nie jest to możliwe, należy przygotować proces sekcji w taki sposób, aby każdy prosektor przeprowadzał sekcję danej tkanki we wszystkich grupach badanych zamiast jednej osoby prowadzącej sekcję wszystkich tkanek z grupy kontrolnej, a innej osoby odpowiedzialnej za grupy badane. Należy zważyć każdą pomocniczą tkankę płciową bez osuszania jej z dokładnością do 0,1 mg i odnotować te pomiary w odniesieniu do każdego zwierzęcia.

51. Szereg tkanek może być bardzo małych lub ich sekcja może sprawiać trudności, co stanie się przyczyną zmienności. Wcześniejsze badania wskazały zakres współczynników zmienności, który wydaje się różnić w zależności od biegłości laboratorium. W kilku przypadkach w obrębie konkretnego laboratorium zaobserwowano znaczne różnice w masie bezwzględnej tkanek takich jak dobrzuszny płat gruczołu krokowego i gruczoły Cowpera.

52. Pomiar masy wątroby, obu nerek i obu nadnerczy jest nieobowiązkowy. Należy jeszcze raz zaznaczyć, że tkanki należy pozbawić przylegającej powięzi i tłuszczu. Wątrobę należy zważyć i pomiar odnotować z dokładnością do 0,1 g; obie nerki i nadnercza zważyć i pomiar odnotować z dokładnością do 0,1 mg. Wątroba, nerki i nadnercza nie tylko pozostają pod wpływem androgenów; stanowią również źródło przydatnych wskaźników toksyczności ogólnoustrojowej.

53. Pomiar poziomu hormonu luteinizującego w surowicy (LH), hormonu folikulotropowego (FSH) i testosteronu (T) jest nieobowiązkowy. Określenie poziomów T w surowicy jest przydatne, jeżeli badana substancja chemiczna wywołuje metabolizm wątrobowy testosteronu, zmniejszając tym samym jego poziom w surowicy. Bez danych dotyczących T działanie takie może okazać się działaniem wywołanym za pośrednictwem mechanizmu antyandrogennego. Na podstawie poziomów LH można uzyskać informacje o zdolności antyandrogenu nie tylko do pomniejszania masy organów, ale także do oddziaływania na funkcję podwzgórza-przysadki, co w badaniach długoterminowych może wywołać nowotwory jąder. FSH jest ważnym hormonem w procesie spermatogenezy. Pomiar poziomu T4 i T3 w surowicy, na podstawie którego uzyskano by dodatkowe informacje dotyczące zdolności do zakłócania homeostazy hormonu tarczycy, również jest nieobowiązkowy. Jeżeli pomiary poziomów hormonów mają zostać wykonane, szczury należy poddać znieczuleniu przed sekcją i pobrać krew przez punkcję serca, a metodę znieczulania należy wybrać z zachowaniem ostrożności w taki sposób, aby nie oddziaływała na pomiar hormonów. Należy odnotować metodę przygotowania surowicy, źródło do badania radioimmunologicznego lub inny zestaw pomiarowy, procedury analityczne oraz wyniki. Poziomy LH należy odnotować jako ng na ml surowicy, a poziomy T także należy odnotowywać jako ng na ml surowicy.

54. Sekcja tkanek jest opisywana w następujący sposób wraz ze szczegółowymi informacjami dotyczącymi sekcji, do których dołączone są zdjęcia, publikowane jako materiały uzupełniające w ramach programu walidacyjnego (21). Materiał wideo dotyczący sekcji jest również dostępny na stronach internetowych koreańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (22).

— Po ułożeniu zwierzęcia powierzchnią brzuszną zwróconą do góry należy ustalić, czy napletek prącia oddzielił się od żołędzia. Jeżeli tak, należy następnie zsunąć napletek i usunąć żołądź, zważyć (z dokładnością do 0,1 mg) i odnotować pomiar.

— Rozciąć skórę i ścianę brzucha, odsłaniając narządy wewnętrzne. Jeżeli dokonuje się nieobowiązkowego pomiaru masy narządów, należy usunąć i zważyć wątrobę z dokładnością do 0,1 g, usunąć żołądek i jelita, usunąć i zważyć obie nerki i oba nadnercza z dokładnością do 0,1 mg. W wyniku sekcji odsłonięty zostaje pęcherz i rozpoczyna się sekcja docelowych męskich płciowych gruczołów dodatkowych.

— W celu przeprowadzenia sekcji dobrzusznego płata gruczołu krokowego należy oddzielić pęcherz od warstwy mięśnia brzusznego, przecinając tkankę łączną wzdłuż linii środkowej. Przesunąć pęcherz do przodu w kierunku pęcherzyków nasiennych, odsłaniając lewy i prawy dobrzuszny płat gruczołu krokowego (pokrytego warstwą tłuszczu). Ostrożnie wycisnąć tłuszcz z prawego i lewego płata dobrzusznego gruczołu krokowego. Delikatnie odsunąć prawy dobrzuszny płat gruczołu krokowego od cewki moczowej i odciąć go od cewki moczowej. Przytrzymując prawy dobrzuszny płat gruczołu krokowego, delikatnie odsunąć lewy dobrzuszny płat gruczołu krokowego od cewki moczowej i następnie dokonać jego wycięcia; zważyć z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

— W celu przeprowadzenia sekcji pęcherzyków nasiennych i gruczołów koagulujących przesunąć pęcherz w kierunku ogona, odkrywając nasieniowód oraz prawy i lewy płat pęcherzyków nasiennych i gruczołów koagulujących. Należy zapobiec wyciekowi płynu przez zaciśnięcie kleszczyków chirurgicznych u podstawy pęcherzyków nasiennych i gruczołów koagulujących w miejscu łączenia się nasieniowodu z cewką moczową. Ostrożnie wyciąć pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące, zacisnąć kleszczyki chirurgiczne i usunąć tłuszcz i przydatki, umieścić w szalce do ważenia, zdjąć kleszczyki, zważyć z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

— W celu przeprowadzenia sekcji mięśnia dźwigacza odbytu i mięśnia opuszkowo-jamistego należy odsłonić mięśnie i podstawę prącia. Mięśnie dźwigacze odbytu otaczają okrężnicę, a przednie mięśnie dźwigacza odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste połączone są z opuszkami prącia. Należy usunąć skórę i przydatki z okolicy okołoodbytowej rozciągającej się od podstawy prącia do przedniej krawędzi odbytu. Mięśnie opuszkowo-jamiste odcina się stopniowo od opuszka prącia i tkanek. Po rozcięciu okrężnicy na dwie części można dokonać sekcji i usunąć mięśnie dźwigacze odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste. Mięśnie dźwigacze odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste należy oczyścić z tłuszczu i przydatków, zważyć z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

— Po usunięciu mięśni dźwigaczy odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych można dojrzeć okrągłe gruczoły Cowpera lub gruczoły opuszkowo-cewkowe u podstawy opuszków prącia, nieco bliżej grzbietu. Należy zachować ostrożność przy wycinaniu, aby uniknąć naruszenia cienkiej torebki i wycieku płynu. Należy zważyć oba gruczoły Cowpera lub gruczoły opuszkowo-cewkowe z dokładnością do 0,1 mg i odnotować pomiar.

— Ponadto jeżeli w trakcie sekcji i wycinania nastąpi utrata płynu z któregokolwiek gruczołu, fakt ten należy odnotować.

55. Jeżeli ocena każdej substancji chemicznej wymaga sekcji większej liczby zwierząt niż liczba, jaką można wykonać w ciągu jednego dnia, rozpoczęcie badań można rozłożyć na dwa kolejne dni, co skutkuje rozłożeniem sekcji i związanych z tym prac na dwa dni. Jeżeli nastąpi takie rozłożenie badań w czasie, należy wykorzystać połowę zwierząt z grupy badanej.

56. Zwłoki zwierząt należy zutylizować w odpowiedni sposób po przeprowadzeniu sekcji.

SPORZĄDZANIE SPRAWOZDANIA

Dane

57. Dane należy zgłaszać indywidualnie (tj. masa ciała, masa dodatkowych gruczołów płciowych, pomiary nieobowiązkowe i inne reakcje oraz spostrzeżenia) i w odniesieniu do każdej grupy zwierząt (średnie i odchylenia standardowe wszystkich dokonanych pomiarów). Dane należy zestawić w formie tabeli. Dane powinny określać liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które poniosły śmierć podczas badania lub które wykazały oznaki toksyczności, opis zaobserwowanych oznak toksyczności, w tym czas ich pojawienia się, czas trwania i dotkliwość.

58. W końcowym sprawozdaniu należy uwzględnić następujące informacje:

Placówka badawcza:

— nazwa obiektu, lokalizacja,

— kierownik badań i pozostali pracownicy oraz ich obowiązki w trakcie badań,

— daty rozpoczęcia i zakończenia badań, tj. kolejno pierwszy dzień podawania badanej substancji chemicznej i ostatni dzień sekcji.

Badana substancja chemiczna:

— źródło, numer partii/serii, nazwa, czystość, pełny adres dostawcy i charakterystyka badanych substancji chemicznych,

— właściwości fizyczne i w stosownych przypadkach właściwości fizykochemiczne,

— warunki przechowywania oraz metoda i częstotliwość przygotowywania rozcieńczeń,

— wszelkie dane dotyczące stabilności,

— wszelkie analizy dawkowanych roztworów/zawiesin.

Nośnik:

— charakterystyka nośnika (nazwa, dostawca i numer partii),

— uzasadnienie wyboru danego nośnika (jeżeli nośnikiem nie jest woda).

Badane zwierzęta i procedury hodowli zwierząt:

— wykorzystany gatunek/szczep i uzasadnienie jego wyboru,

— źródło lub dostawca zwierząt, w tym pełne dane adresowe,

— liczba i wiek dostarczonych zwierząt,

— warunki trzymania (temperatura, oświetlenie itp.),

— pasza (nazwa, rodzaj, dostawca, numer partii, skład i, o ile są znane, poziomy fitoestrogenów),

— ściółka (nazwa, rodzaj, dostawca, skład),

— warunki umieszczania zwierząt w klatkach i liczba zwierząt przypadająca na jedną klatkę.

Warunki testu:

— wiek w momencie kastracji, czas trwania aklimatyzacji po kastracji,

— indywidualne masy ciała zwierząt na początku badania (z dokładnością do 0,1 g),

— proces randomizacji i zapis dotyczący przydzielenia zwierząt do grupy nośnika, grupy odniesienia, grup badanej substancji chemicznej oraz klatek,

— średnia i odchylenie standardowe mas ciała w odniesieniu do każdej grupy w odniesieniu do każdego dnia ważenia w trakcie badań,

— uzasadnienie wyboru dawki,

— droga podania badanej substancji chemicznej i uzasadnienie wyboru drogi narażenia,

— w przypadku stosowania testu dotyczącego antyandrogenności, informacje dotyczące dawkowania propionatu testosteronu (dawka i objętość),

— dawkowanie badanej substancji chemicznej (dawka i objętość),

— czas dawkowania,

— procedury dotyczące sekcji, w tym sposoby wykrwawienia i środki znieczulenia,

— jeżeli przeprowadza się analizę surowicy, należy przedstawić szczegóły zastosowanych metod. Na przykład jeżeli stosuje się RIA, należy przedstawić procedurę RIA, źródło narzędzi używanych do RIA, daty wygaśnięcia przydatności narzędzi, procedurę pomiaru scyntylacyjnego oraz standaryzację.

Wyniki:

— codzienne obserwacje każdego zwierzęcia w trakcie dawkowania, obejmujące:

— masę ciała (z dokładnością do 0,1 g),

— objawy kliniczne (jeżeli takie występują),

— wszelkie pomiary lub uwagi w odniesieniu do spożycia pokarmu.

— obserwacje w trakcie sekcji w odniesieniu do każdego zwierzęcia, obejmujące:

— datę sekcji,

— grupę badaną, do której należy zwierzę,

— numer identyfikacyjny zwierzęcia,

— prosektora,

— porę dnia, kiedy wykonuje się sekcję i wycinanie,

— wiek zwierzęcia,

— końcową masa ciała przy sekcji, z wyszczególnieniem wszelkich istotnych statystycznie wzrostów lub spadków,

— kolejność wykrwawiania zwierzęcia i wycinania w trakcie sekcji,

— masy pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów:

— dobrzuszny płat gruczołu krokowego (z dokładnością do 0,1 mg),

— pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące, w tym płyny (oba, z dokładnością do 0,1 mg),

— zespół mięśni dźwigaczy odbytu i mięśni opuszkowo-jamistych (z dokładnością do 0,1 mg),

— gruczoły Cowpera (waga obu gruczołów natychmiast po sekcji, z dokładnością do 0,1 mg),

— żołądź (waga natychmiast po sekcji, z dokładnością do 0,1 mg),

— masy tkanek z pomiarów nieobowiązkowych, jeżeli takie zostały wykonane:

— wątroba (z dokładnością do 0,1 g),

— nerka (obie, z dokładnością do 0,1 mg),

— nadnercze (oba, z dokładnością do 0,1 mg),

— ogólne uwagi i spostrzeżenia,

— analiza poziomu hormonów w surowicy, jeżeli taka została wykonana:

  — LH w surowicy (nieobowiązkowe — ng na ml surowicy), oraz

  — poziom T w surowicy (nieobowiązkowe — ng na ml surowicy),

— ogólne uwagi i spostrzeżenia.

Zestawienie danych:

Dane należy zestawić w formie tabeli obejmującej wielkość próby w odniesieniu do każdej grupy, średnią wartości, błąd standardowy średniej lub odchylenie standardowe. W tabelach należy uwzględnić masy ciała zmierzone w trakcie sekcji, zmiany masy ciała od rozpoczęcia dawkowania aż do sekcji, masy docelowych płciowych gruczołów dodatkowych i wszelkie nieobowiązkowe pomiary mas organów.

Omówienie wyników

Analiza wyników

59. Należy dokonać analizy statystycznej mas ciała i organów zmierzonych w trakcie sekcji pod względem właściwości takich jak homogeniczność wariancji z odpowiednimi przekształceniami danych w razie potrzeby. Grupy badane należy porównać z grupami kontrolnymi, korzystając z technik takich jak ANOVA, a następnie porównanie w parach (np. jednostronny test Dunnetta) oraz kryterium różnicy statystycznej, na przykład $p \leq 0,05$. Należy zidentyfikować grupy, które uzyskują istotność statystyczną. Należy jednak unikać »względnych« mas »organów« ze względu na nieważne statystyczne założenia stanowiące podstawę takich manipulacji danymi.

60. W przypadku agonistów androgenów kontrolę powinna stanowić grupa nośnika. Właściwości sposobu działania badanej substancji chemicznej mogą doprowadzić do różnych reakcji względnych między tkankami, na przykład trenbolon, który nie może ulec przemianie pod wpływem 5-alfa-reduktazy, ma bardziej widoczny wpływ na mięsień dźwigacz odbytu i mięśnie opuszkowo-jamiste oraz żołądź niż propionat testosteronu. Istotny statystycznie wzrost ($p \leq 0,05$) masy którychkolwiek dwóch lub większej liczby spośród pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów (dobrzuszny płat gruczołu krokowego, mięsień-dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, żołądź, gruczoły koagulujące oraz pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące) należy uznać za dodatni wynik działania agonisty androgenu, przy czym pewien zwiększony wzrost powinien cechować wszystkie docelowe tkanki. Połączoną ocenę wszystkich reakcji płciowych gruczołów dodatkowych można by uzyskać, korzystając z odpowiedniej wielowymiarowej analizy danych. Mogłoby to poprawić jakość analizy, szczególnie w przypadkach, w których tylko pojedyncza tkanka odznacza się istotną statystycznie reakcją.

61. W przypadku antagonistów androgenu grupę kontrolną powinna stanowić grupa badana, której podano androgen referencyjny (wyłącznie propionat testosteronu). Charakterystyka działania badanej substancji chemicznej może doprowadzić do różnych reakcji względnych między tkankami, na przykład inhibitory 5-alfa-reduktazy, jak finasteryd, mają bardziej widoczny wpływ na dobrzuszny płat gruczołu krokowego niż na inne tkanki w porównaniu do silnych antagonistów receptora androgenowego, jak flutamid. Istotny statystycznie spadek ($p \leq 0,05$) masy którychkolwiek dwóch lub większej liczby spośród pięciu docelowych tkanek zależnych od androgenów (dobrzuszny płat gruczołu krokowego, mięsień-dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, żołądź, gruczoły koagulujące oraz pęcherzyki nasienne i gruczoły koagulujące) w stosunku do dawkowania samego propionatu testosteronu należy uznać za dodatni wynik działania antagonisty androgenu, przy czym pewien zwiększony wzrost powinien cechować wszystkie docelowe tkanki. Połączoną ocenę wszystkich reakcji płciowych gruczołów dodatkowych można by uzyskać, korzystając z odpowiedniej wielowymiarowej analizy danych. Mogłoby to poprawić jakość analizy, szczególnie w przypadkach, w których tylko pojedyncza tkanka odznacza się istotną statystycznie reakcją.

62. Dane należy zestawić w formie tabeli, obejmującej średnią, błąd standardowy średniej (odchylenie standardowe również byłoby dopuszczalne) oraz wielkość próby w odniesieniu do każdej grupy. Należy również dołączyć poszczególne tabele z danymi. Należy przeanalizować wartości indywidualne, średnią, błąd standardowy (odchylenie standardowe) i wartości współczynnika zmienności dla danych kontroli w celu ustalenia, czy spełniają one dopuszczalne kryteria pod względem spójności z przewidywanymi wartościami historycznymi. Współczynniki zmienności, które przekraczają wartości współczynnika zmienności przedstawione w tabeli 1 (zob. pkt 25 i 26) w odniesieniu do każdej masy narządu powinny wskazywać, czy istnieją błędy w zapisie lub wprowadzaniu danych lub czy laboratorium osiągnęło już biegłość w przeprowadzaniu dokładnej sekcji tkanek zależnych od androgenów i czy uzasadnione jest zalecanie dalszych szkoleń/praktyki w tym zakresie. Zasadniczo współczynniki zmienności (odchylenie standardowe podzielone przez średnią masę narządu) są odtwarzalne w ramach różnych

badań prowadzonych przez różne laboratoria. Przedstawione dane powinny obejmować co najmniej: dobrzuszny płat gruczołu krokowego, pęcherzyk nasienny, mięsień dźwigacz odbytu i mięsień opuszkowo-jamisty, gruczoły Cowpera, żołądź, wątrobę i masy ciała oraz zmiany mas ciała od początku dawkowania aż do sekcji. Dane można przedstawić także po skorygowaniu kowariancji w odniesieniu do masy ciała, jednak nie powinno to zastępować przedstawienia danych nieskorygowanych. Ponadto jeżeli oddzielenie napletka nie wystąpiło w żadnej z grup, przypadek ten należy odnotować i porównać statystycznie z grupą kontrolną, stosując dokładny test Fishera.

63. Sprawdzając wprowadzone dane komputerowe z oryginalnymi arkuszami danych pod względem dokładności, wartości masy narządów, które nie są biologicznie wiarygodne lub różnią się ponad trzema odchyleniami standardowymi od średniej w grupie badanej, należy dokładnie przeanalizować i ewentualnie rozważyć konieczność odrzucenia ich, ponieważ prawdopodobnie stanowią one błędy zapisu.

64. Porównanie wyników badań z wartościami współczynnika zmienności OECD (w tabeli 1) często jest ważnym krokiem w kierunku interpretacji w zakresie ważności wyników badań. Należy zachować dane historyczne dotyczące grup kontrolnych nośnika w laboratorium. Dane historyczne dotyczące reakcji na pozytywne substancje chemiczne odniesienia, takie jak propionat testosteronu i flutamid, również należy zachować w laboratorium. Laboratoria mogą także okresowo badać reakcję na działanie znanych słabych agonistów i antagonistów androgenów i przechowywać te dane. Dane te można porównać z dostępnymi danymi OECD, aby zapewnić statystyczną dokładność i moc metod stosowanych przez laboratorium.

Dodatek 1

DEFINICJE:

Androgenny jest terminem stosowanym do określenia dodatniego wpływu na rozwój tkanek zależnych od androgenów.

Antyandrogenny oznacza zdolność substancji chemicznej do tłumienia działania propionatu testosteronu w organizmie ssaków.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

Data urodzenia oznacza dzień 0 po urodzeniu.

Dawka oznacza ilość podawanej badanej substancji chemicznej. Do celów testu biologicznego Hershbergera dawkę wyraża się jako masę badanej substancji chemicznej na jednostkową masę ciała zwierzęcia na dobę (np. mg/kg masy ciała/dobę).

Dawkowanie jest terminem ogólnym obejmującym dawkę, częstotliwość i czas trwania dawkowania.

Agonalny jest terminem stosowanym do określenia zwierzęcia w stanie śmierci, tj. zbliżającego się do momentu śmierci.

Dzień X po urodzeniu oznacza X-ty dzień życia od dnia urodzenia.

Czułość oznacza potencjał metody badawczej w zakresie poprawnego identyfikowania substancji chemicznych posiadających badaną właściwość.

Swoistość oznacza potencjał metody badawczej w zakresie poprawnego identyfikowania substancji chemicznych nieposiadających badanej właściwości.

Badana substancja chemiczne oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Walidacja oznacza proces naukowy opracowany w celu scharakteryzowania wymogów operacyjnych i ograniczeń metody badawczej oraz w celu przedstawienia jej wiarygodności i znaczenia w odniesieniu do poszczególnego celu.

Dodatek 2

Uwaga: Dokument sporządzony przez członków sekretariatu programu wytycznych dotyczących badań w oparciu o porozumienie osiągnięte na szóstym posiedzeniu grupy zadaniowej ds. badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Ramy koncepcyjne OECD w zakresie badań i oceny substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego

Poziom 1 Sortowanie i ustalenie substancji priorytetowych w oparciu o istniejące informacje	— Właściwości fizyczne i chemiczne, np. masa cząsteczkowa, reaktywność, lotność, biodegradowalność — Narażenie ludzi i narażenie środowiskowe, np. wielkość produkcji, uwalnianie, wzory używania — Zagrożenie, np. dostępne dane toksykologiczne	
Poziom 2 Testy *in vitro* dostarczające danych dotyczących mechanizmów działania	— Podobieństwo wiązań receptorowych ER, AR, TR — Aktywacja transkrypcji — Aromatazaisteroidogeneza *in vitro* — Rozpoznanie/wiązanie węglowodorowego receptora arylowego — QSAR	— Wysoka przepustowość badań wstępnych — Czynność tarczycy — Test witellogeniny (VTG) w hepatocytachu ryb — Inne (w stosownych przypadkach)
Poziom 3 Testy *in vivo* dostarczające danych dotyczących pojedynczych mechanizmów i efektów układu hormonalnego	— Test wzrostu macicy (pochodzenie estrogenne) — Test Hershbergera (pochodzenie androgenne) — Działanie hormonalne o podłożu niereceptorowym — Inne (np. tarczyca)	— Test witellogeniny (VTG) u ryb (pochodzenie estrogenne)
Poziom 4 Testy *in vivo* dostarczające danych dotyczących wielu mechanizmów i efektów układu hormonalnego	— Rozszerzona wytyczna OECD nr 407 (punkty końcowe w oparciu o mechanizmy układu hormonalnego) — Testy dojrzewania płciowego u samców i samic — Test dorosłych samców niepoddanych kastracji	— Badanie histopatologiczne gonad u ryb — Test metamorfozy żab
Poziom 5 Testy *in vivo* dostarczające danych dotyczących działań mechanizmów układu hormonalnego i innych mechanizmów	— Test jednego pokolenia (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 415)[1] — Test dwóch pokoleń (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 416)[1] — Badanie przesiewowe w zakresie rozrodczości (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 421)[1] — Łączone 28-dniowe badanie przesiewowe / badanie przesiewowe w zakresie rozrodczości (rozszerzona wytyczna dotycząca badań nr 422)[1] [1] VMG mamm rozważy możliwe udoskonalenia	— Częściowe i pełne testy cykli życia ryb, ptaków, płazów i bezkręgowców (testy rozwojowe I testy w zakresie rozrodczości)

VMG mamm: zespół zarządzania walidacją ds. badań i oceny ssaków

UWAGI DO POWYŻSZYCH RAM

Uwaga 1: Istnieje możliwośćrozpoczynania i rezygnacji na wszystkich poziomach i zależy to od charakteru istniejącego zapotrzebowania na informacje do celów oceny zagrożenia i ryzyka.

Uwaga 2: Na poziomie 5 w badaniach z zakresu ekotoksykologii należy zawrzeć punkty końcowe wskazujące mechanizmy niepożądanych skutków i potencjalne szkody dla populacji.

Uwaga 3: W przypadku gdy model multimodalny obejmuje kilka testów pojedynczych punktów końcowych, przedmiotowy model zastąpi stosowanie tych testów pojedynczych punktów końcowych.

Uwaga 4: Ocena każdej substancji chemicznej powinna opierać się na indywidualnych przypadkach, z uwzględnieniem wszystkich dostępnych informacji, mając na uwadze rolę poziomów powyższych ram koncepcyjnych.

Uwaga 5: Obecnie nie należy traktować powyższych ram koncepcyjnych jako wytycznych obejmujących wszystkie kwestie. Poziomy 3, 4 i 5 obejmują testy, które są dostępne lub w odniesieniu do których trwa proces walidacji. W odniesieniu do tej ostatniej kwestii testy te zostały tymczasowo włączone. Po ich opracowaniu i przeprowadzeniu walidacji zostaną oficjalnie dodane do ram koncepcyjnych.

Uwaga 6: Nie należy uznawać, że poziom 5 zawiera wyłącznie badania ostateczne. Uznaje się, że badania uwzględnione na tym poziomie przyczyniają się do ogólnej oceny zagrożenia i ryzyka.

LITERATURA

(1) OECD (1998), »Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force«, 10–11 marca 1998 r., ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman, R.I. (1962), *Standard methods adopted by official organization*,Academic Press, NY.

(3) Gray, L.E. Jr, Furr, J. i Ostby, J.S. (2005), »Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rat.« [w:] *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 no. 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 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories«, *Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment No. 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 No. 73*, ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W., Zeiger, E., Walker, M., Ashby, J., Onyon, L., Gray, Jr, L.E. (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, L.E., 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 studiem«, *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, G.S. (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, G.S., Elliott, H.W. (1949), »Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic 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 metod«, *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175–180.

(14) Hilgar, A.G., Vollmer, E.P. (1964), *Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic*, Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman, R.I. (1969). »Androgens and anabolic agents«, [w:] *Methods in Hormone Research, volume IIA,* (Dorfman, R.I., red.) New York: Academic Press, 151–220.

(16) Massaro, E.J. (2002), *Handbook of Neurotoxicology, volume I*. New York: Humana Press, s. 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), *Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju — 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) Materiały uzupełniające do Owens i in. (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. Zob. sekcja II, wytyczne dotyczące przeprowadzania sekcji zapewniane laboratoriom, dostępne na stronie internetowej: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Referencyjny przewodnik wizualny dotyczący procedury testu Hershbergera zawierający materiał wideo na temat sekcji. Dostępny na stronie internetowej: 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) Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych (Dz.U. L 276 z 20.10.2010, s. 33).

(27) Następujące rozdziały niniejszego załącznika:

B.1 bis, toksyczność ostra pokarmowa — procedura z wykorzystaniem stałej dawki

B.1 ter, toksyczność ostra pokarmowa — metoda klas ostrej toksyczności

B.56. **ROZSZERZONE BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCYJNEJ JEDNEGO POKOLENIA**

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 443 (2012 r.). Metoda ta opiera się na propozycji Międzynarodowego Instytutu Nauk Biologicznych (ILSI)-Instytutu Badań Środowiskowo-Zdrowotnych (HESI), Komitetu Technicznego ds. Oceny Bezpieczeństwa Chemicznego w Rolnictwie (ACSA) dotyczącej rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia na etapie życia pokolenia F_1, jak przedstawiono w publikacji Cooper i in., 2006 r. (1). W projekcie badania wprowadzono kilka ulepszeń i wyjaśnień, aby zapewnić elastyczność i podkreślić znaczenie wykorzystania z istniejącej wiedzy z jednoczesnym uwzględnieniem obserwacji na żywych zwierzętach w celu ukierunkowania i dostosowania badań. Przedmiotowa metoda badawcza zapewnia szczegółowy opis prowadzenia rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia. W ramach tej metody badawczej opisuje się trzy kohorty zwierząt z pokolenia F_1:

kohorta 1: ocena reprodukcyjnych/rozwojowych punktów końcowych; kohortę tę można rozszerzyć na pokolenie F_2,

kohorta 2: ocena potencjalnego wpływu narażenia na działanie substancji chemicznych na rozwijający się układ nerwowy,

kohorta 3: ocena potencjalnego wpływu narażenia na działanie substancji chemicznych na rozwijający się układ odpornościowy.

2. Decyzje dotyczące tego, czy przeprowadzić ocenę drugiego pokolenia i pominąć kohortę neurotoksyczności rozwojowej lub kohortę immunotoksyczności rozwojowej, powinny odzwierciedlać stan istniejącej wiedzy na temat substancji chemicznej podlegającej ocenie, a także potrzeby różnych organów regulacyjnych. Celem omawianej metody badawczej jest przedstawienie szczegółowych informacji o możliwych sposobach przeprowadzenia badania i wyjaśnienie, w jaki sposób należy oceniać każdą kohortę.

3. Procedura podejmowania decyzji dotyczącej wewnętrznego uruchamiania tworzenia drugiego pokolenia jest opisana w wytycznej OECD nr 117 (39) skierowanej do tych organów regulacyjnych, które stosują wewnętrzne czynniki uruchamiające.

USTALENIA WSTĘPNE I CELE

4. Głównym celem rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia jest ocena poszczególnych etapów życia nieobjętych innymi rodzajami badań toksyczności oraz zbadanie skutków, które mogą pojawić się w wyniku narażenia na działanie substancji chemicznych w okresie przed- i pourodzeniowym. W przypadku reprodukcyjnych punktów końcowych przewiduje się, że pierwszym krokiem jest wykorzystanie, w miarę dostępności, informacji z badań toksyczności dawki powtórzonej (w tym badań przesiewowych toksyczności reprodukcyjnej, np. wytyczna OECD nr 422 (32)) lub z krótkoterminowych badań przesiewowych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (np. test wzrostu macicy — metoda badawcza B.54 (36) i test Hershbergera — metoda badawcza B.55 (37)) w celu wykrycia wpływu na narządy rozrodcze samców i samic. Może to dotyczyć spermatogenezy (histopatologii jąder) w przypadku samców oraz cykli estrogenowych, liczby pęcherzyków jajnikowych/dojrzewania oocytów oraz integralności jajników (histopatologii) w przypadku samic. Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia służy zatem jako badanie reprodukcyjnych punktów końcowych, które wymagają interakcji samców z samicami, samic z jajem płodowym oraz samic z potomstwem i pokoleniem F_1 aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej (zob. wytycza OECD nr 151 dotycząca tej metody badawczej (40)).

5. Przedmiotowa metoda badawcza ma zapewnić ocenę przed- i pourodzeniowego wpływu działania substancji chemicznych na rozwój, a także dogłębną ocenę toksyczności ogólnoustrojowej u samic w okresie ciąży i laktacji oraz u młodego i dorosłego potomstwa. Oczekuje się, że szczegółowe badanie głównych rozwojowych punktów końcowych, takich jak żywotność potomstwa, zdrowie noworodków, stan rozwoju w momencie narodzin oraz rozwój fizyczny i funkcjonalny aż do osiągnięcia dorosłości, pozwoli zidentyfikować konkretne organy docelowe u potomstwa. Ponadto badanie pozwoli uzyskać lub potwierdzić informacje na temat wpływu badanej substancji chemicznej na integralność i funkcjonowanie układów rozrodczych dorosłych samców i samic. Pod uwagę brane są w szczególności, ale nie wyłącznie, następujące parametry: czynność gonad, cykl estrogenowy, dojrzewanie plemników w najądrzach, zachowanie kopulacyjne, zapłodnienie, ciąża, poród i laktacja. Ponadto informacje uzyskane z ocen neurotoksyczności rozwojowej i immunotoksyczności rozwojowej pozwolą scharakteryzować potencjalne oddziaływanie na te układy. Dane otrzymane z tych badań powinny umożliwiać określenie poziomów dawkowania, przy których nie obserwuje się szkodliwych zmian (poziomy NOAEL), najniższych poziomów, przy których obserwuje się szkodliwe zmiany (LOAEL), lub dawek wyznaczających dla różnych punktów końcowych lub powinny zostać wykorzystane w celu scharakteryzowania skutków wykrytych w poprzednich badaniach toksyczności dawki powtórzonej lub służyć jako wskazówki dla kolejnych badań.

6. Schemat protokołu przedstawiono na rysunku 1. Badaną substancję chemiczną podaje się w sposób ciągły w dawkach stopniowanych kilku grupom dojrzałych płciowo samców i samic. Przedmiotowe pokolenie rodzicielskie (P) otrzymuje dawkę przez ustalony okres poprzedzający krycie (wybrany na podstawie dostępnych informacji dla badanej substancji chemicznej; jednak przez co najmniej dwa tygodnie) oraz w trakcie dwutygodniowego okresu krycia. Samcom z pokolenia P nadal podaje się substancję przynajmniej do momentu odsadzenia pokolenia F_1. Należy im podawać substancję przez co najmniej 10 tygodni. Okres ten można wydłużyć, jeżeli zachodzi konieczność wyjaśnienia wpływu na reprodukcję. Samicom z pokolenia P podaje się substancję również w trakcie ciąży i laktacji aż do zakończenia badania po odsadzeniu miotu (tj. przez 8–10 tygodni). Potomstwo z pokolenia F_1 nadal otrzymuje badaną substancję chemiczną od momentu odsadzenia do osiągnięcia dorosłości. Jeżeli ocenie będzie poddane drugie pokolenie (zob. wytyczna OECD nr 117 (39)), potomstwo z pokolenia F_1 nadal będzie otrzymywało substancję aż do odsadzenia pokolenia F_2 lub do momentu zakończenia badania.

7. Wszystkie zwierzęta poddaje się obserwacjom klinicznym i badaniom patologicznym pod kątem oznak toksyczności, ze szczególnym uwzględnieniem integralności i funkcjonowania układów rozrodczych samców i samic oraz zdrowia, wzrostu, rozwoju i funkcji rozrodczych potomstwa. Po odsadzeniu wybrane potomstwo przydziela się do specjalnych podgrup (kohorty 1–3, zob. pkt 33 i 34 oraz rys. 1) w celu prowadzenia dalszych badań, w tym dotyczących dojrzałości płciowej, integralności i funkcji narządów rozrodczych oraz neurologicznych i behawioralnych punktów końcowych, a także funkcji odpornościowych.

8. Przy prowadzeniu badania należy przestrzegać zasad i ustaleń określonych w dokumencie zawierającym wytyczne OECD nr 19 »Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations« (34) (Wytyczne dotyczące uznawania, oceny i wykorzystywania objawów klinicznych jako punktów humanitarnego zakończenia w odniesieniu do zwierząt doświadczalnych wykorzystywanych w ocenach bezpieczeństwa).

9. Kiedy dostępna będzie wystarczająca liczba badań umożliwiająca ustalenie wpływu tego nowego projektu badania, przedmiotowa metoda badawcza zostanie poddana przeglądowi i w razie potrzeby poprawiona z uwzględnieniem zdobytych doświadczeń.

Rysunek 1

Schemat rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia

Pokolenie rodzicielskie	Kohorta	Oznaczenie	Zwierzęta/kohortę	Dojrzałość płciowa	Przybliżony wiek w momencie sekcji zwłok (w tygodniach)
Celem jest 20 miotów na grupę	1A	Toksyczność reprodukcyjna	20 M + 20 F	Tak	13
	1B	Toksyczność reprodukcyjna	20 M + 20 F	Tak	14 lub 20–25 w przypadku wywołania
	2A	Neurotoksyczność	10 M + 10 F @	Tak	11-12
	2B	Neurotoksyczność	10 M + 10 F @	Nie	3
	3	Immunotoksyczność	10 M + 10 F @	Tak	8
	Zwierzęta nieprzydzielone	Inne		Nie	3

@ jedno zwierzę na miot, w miarę możliwości reprezentatywne dla wszystkich 20 miotów

OPIS METODY/PRZYGOTOWANIA DO BADANIA

Zwierzęta

Wybór gatunków zwierząt i szczepu

10. Należy dokładnie rozważyć wybór gatunków do badania toksyczności reprodukcyjnej, uwzględniając wszystkie dostępne informacje. Ze względu na zakres danych kontekstowych i porównywalność z badaniami toksyczności ogólnej gatunkiem preferowanym jest jednak zazwyczaj szczur i do tego gatunku odnoszą się kryteria i zalecenia przedstawione w przedmiotowej metodzie badawczej. W przypadku wykorzystania innego gatunku należy przedstawić uzasadnienie i dokonać odpowiednich modyfikacji w protokole. Nie należy wykorzystywać szczepów o niskiej płodności i powszechnie znanej dużej częstości występowania samorzutnych wad rozwojowych.

Wiek, masa ciała i kryteria włączenia do badania

11. Należy wykorzystywać zdrowe zwierzęta rodzicielskie, których wcześniej nie poddawano procedurom badawczym. Należy objąć badaniem zarówno samce, jak i samice, przy czym samice powinny być nieródkami i nie mogą być w ciąży. Zwierzęta z pokolenia P powinny być dojrzałe płciowo, o podobnej masie (w obrębie jednej płci) w momencie rozpoczęcia dawkowania, w podobnym wieku (około 90 dni) w momencie krycia oraz powinny być reprezentatywne dla danego gatunku i szczepu objętego badaniem. Po dostarczeniu do laboratorium zwierzęta należy poddać aklimatyzacji przez co najmniej 5 dni. Zwierzęta przydziela się losowo do grupy kontrolnej i grupy badanej w sposób, który zapewnia uzyskanie porównywalnych średnich wartości masy ciała między grupami (tj. ± 20 % średniej).

Warunki trzymania i żywienia

12. Temperatura w pomieszczeniu badawczym powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Wilgotność względna powinna być na poziomie 30–70 %, najlepiej w zakresie od 50 do 60 %. Cykl sztucznego oświetlenia należy ustawić na 12 godzin światła i 12 godzin ciemności. Można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne, zapewniając nieograniczony dostęp do wody pitnej. Należy zwrócić szczególną uwagę na zawartość fitoestrogenów w paszy,

ponieważ ich wysoki poziom w paszy może mieć wpływ na niektóre reprodukcyjne punkty końcowe. Zaleca się standardowe pasze w otwartej formie użytkowej, w których zmniejszono zawartość substancji estrogennych (2) (30). Na wybór paszy może mieć wpływ potrzeba zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej w przypadku podawania jej w ramach opisywanej metody. Należy zweryfikować skład, jednorodność i stabilność badanej substancji chemicznej w paszach. Paszę i wodę pitną należy regularnie badać na obecność zanieczyszczeń. Próbki każdej partii paszy użytej podczas badania należy przechowywać w odpowiednich warunkach (np. zamrożone w temperaturze – 20 °C) do momentu sporządzenia sprawozdania, na wypadek gdyby wyniki wymagały dalszej analizy składników paszy.

13. Zwierzęta należy umieścić w klatkach w małych grupach osobników tej samej płci i należących do tej samej grupy badanej. Zwierzęta można trzymać oddzielnie w celu uniknięcia potencjalnych obrażeń (np. samce po okresie krycia). Procedury krycia należy przeprowadzać w klatkach nadających się do tego celu. Po stwierdzeniu, że nastąpiła kopulacja, samice, które są prawdopodobnie zapłodnione, są umieszczane oddzielnie w klatkach porodowych lub matczynych, w których mają one dostęp do właściwych i określonych materiałów do budowy gniazda. Mioty trzyma się razem z matkami do odsadzenia. Zwierzęta z pokolenia F_1 należy trzymać w małych grupach osobników tej samej płci należących do tej samej grupy badanej od momentu odsadzenia aż do zakończenia badania. Jeżeli ma to uzasadnienie naukowe, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie. Poziom zawartości fitoestrogenów w wybranym materiale ściółkowym powinien być minimalny.

Liczba i identyfikacja zwierząt

14. Zasadniczo każda grupa badana i grupa kontrolna powinna składać się z wystarczającej liczby kojarzonych par, aby otrzymać co najmniej 20 zapłodnionych samic w każdej grupie dawkowania. Celem jest uzyskanie wystarczającej liczby ciąż, aby zapewnić znaczącą ocenę potencjalnego wpływu substancji chemicznej na płodność, ciążę i zachowania macierzyńskie w pokoleniu P oraz wzrost i rozwój potomstwa z pokolenia F_1 od momentu poczęcia, aż do osiągnięcia dojrzałości. Jeżeli nie zostanie uzyskana pożądana liczba zapłodnionych zwierząt, nie jest to równoznaczne z koniecznością unieważnienia badania i należy dokonać indywidulanej oceny każdego przypadku, biorąc pod uwagę potencjalny związek przyczynowy z badaną substancją chemiczną.

15. Przed rozpoczęciem dawkowania każdemu zwierzęciu z pokolenia P przydziela się niepowtarzalny numer identyfikacyjny. Jeżeli z danych historycznych zgromadzonych przez laboratorium wynika, że znaczna część samic może nie wykazywać regularnego (4- lub 5-dniowego) cyklu estrogenowego, wówczas zaleca się ocenę cykli estrogenowych przed rozpoczęciem dawkowania. Ewentualnie można zwiększyć liczebność grupy, aby zapewnić obecność w każdej grupie co najmniej 20 samic, które będą miały regularne (4- lub 5-dniowe) cykle estrogenowe w momencie rozpoczęcia dawkowania. Całe potomstwo z pokolenia F_1 identyfikuje się w sposób niepowtarzalny podczas pierwszego badania noworodków w dniu 0 lub 1 po urodzeniu. Przez cały okres trwania badania w odniesieniu do wszystkich zwierząt z pokolenia F_1 oraz, w stosownych przypadkach, z pokolenia F_2 należy prowadzić rejestr danych wskazujących na miot pochodzenia.

Badana substancja chemiczna

Dostępne informacje na temat badanej substancji chemicznej

16. Przegląd istniejących informacji jest istotny przy podejmowaniu decyzji w sprawie drogi podawania, wyboru nośnika, wyboru gatunku zwierząt, wyboru dawkowania i potencjalnych modyfikacji schematu dawkowania. Dlatego też, planując rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia, należy uwzględnić wszystkie dostępne istotne informacje na temat badanej substancji chemicznej, tj. właściwości fizykochemiczne, właściwości toksykokinetyczne (w tym dotyczące metabolizmu charakterystycznego dla danego gatunku), właściwości toksykodynamiczne, zależności struktura-aktywność, procesy metaboliczne *in vitro*, wyniki poprzednich badań toksyczności i istotne informacje na temat analogów strukturalnych. Wstępne informacje na temat wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania (ADME) oraz bioakumulacji można uzyskać na podstawie struktury chemicznej, danych fizykochemicznych, stopnia wiązania z białkami osocza lub badań toksykokinetycznych, natomiast wyniki badań toksyczności są źródłem dodatkowych informacji, np. dotyczących poziomu NOAEL, metabolizmu lub indukcji metabolizmu.

Uwzględnienie danych toksykokinetycznych

17. Chociaż nie jest to wymagane, dane toksykokinetyczne uzyskane z przeprowadzonych wcześniej badań służących wyznaczeniu zakresu dawki lub innych badań są niezwykle przydatne przy planowaniu projektu badania, wyborze dawki i interpretacji wyników. Szczególnie użyteczne są dane, które: 1) weryfikują narażenie rozwijających się płodów i młodych na działanie badanej substancji chemicznej (lub odpowiednich metabolitów); 2) zapewniają szacunek dozymetrii wewnętrznej; oraz 3) zapewniają ocenę potencjalnego zależnego od dawki nasycenia

procesów kinetycznych. Należy również uwzględnić dodatkowe dane toksykokinetyczne, jeżeli są dostępne, takie jak profile metabolitów, przebieg stężenia w czasie itp. Uzupełniające dane toksykokinetyczne można również gromadzić w trakcie głównego badania, pod warunkiem że nie koliduje to z gromadzeniem i interpretacją punktów końcowych badania głównego.

Zgodnie z ogólną wytyczną w trakcie planowania rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia przydatny byłby następujący zestaw danych toksykokinetycznych:

— późny etap ciąży (np. dzień 20 ciąży) — krew matki i krew płodu,

— środkowy etap laktacji (dzień 10 po urodzeniu) — krew matki, krew młodego lub mleko,

— wczesny okres po odsadzeniu (np. dzień 28 po urodzeniu) — próbki krwi młodych po odsadzeniu.

Określając konkretne anality (np. pierwotną substancję chemiczną lub metabolity) i schemat pobierania próbek, należy zachować elastyczność. Na przykład liczba i czas pobierania próbek w danym dniu pobierania będą uzależnione od drogi narażenia i wcześniejszej wiedzy na temat właściwości toksykokinetycznych u zwierząt nieciężarnych. W przypadku badań, w których substancja badana podawana jest z paszą, wystarczające jest pobieranie próbek jednokrotnie o tej samej porze każdego dnia podawania substancji, podczas gdy dawkowanie przez sondę może wymagać dodatkowych pobrań próbek w celu uzyskania lepszego szacunku zakresu wewnętrznych dawek. Nie jest jednak konieczne uzyskanie pełnego przebiegu stężenia w czasie w żadnym z dni pobierania. W razie potrzeby krew można łączyć według płci w ramach miotów do celów analiz płodów i noworodków.

Droga podawania

18. Przy wyborze drogi podania należy uwzględnić drogę lub drogi w największym stopniu powiązane z narażeniem ludzi. Mimo że protokół opracowano z myślą o podawaniu badanej substancji chemicznej z paszą, można go zmodyfikować w celu podawania substancji inną drogą (z wodą pitną, przez sondę, drogą wziewną, drogą naskórną) w zależności od cech charakterystycznych substancji i wymaganych informacji.

Wybór nośnika

19. W razie potrzeby badaną substancję chemiczną rozpuszcza się lub przygotowuje jako zawiesinę w odpowiednim nośniku. Zaleca się, aby w miarę możliwości przede wszystkim brać pod uwagę zastosowanie roztworu/zawiesiny w wodzie, a dopiero w dalszej kolejności roztworu/zawiesiny substancji w oleju (np. oleju kukurydzianym). W przypadku nośników innych niż woda właściwości toksyczne tego nośnika powinny być znane. Należy unikać stosowania nośników charakteryzujących się potencjalną swoistą toksycznością (np. aceton, sulfotlenek dimetylu). Należy oznaczyć stabilność badanej substancji chemicznej w nośniku. Jeżeli w celu ułatwienia dawkowania używa się nośnika lub innego dodatku, należy uwzględnić następujące cechy charakterystyczne: wpływ na wchłanianie, dystrybucję, metabolizm lub zatrzymywanie badanej substancji chemicznej; wpływ na właściwości chemiczne badanej substancji chemicznej, co może zmienić jej charakterystykę toksyczną; oraz wpływ na przyjmowanie pokarmu lub wody lub stan odżywienia zwierząt.

Wybór dawki

20. Zasadniczo w ramach badania należy podać co najmniej trzy dawki i zapewnić równoczesną kontrolę. Przy wyborze odpowiednich poziomów dawek badacz powinien uwzględnić wszystkie dostępne informacje, w tym informacje dotyczące dawkowania z poprzednich badań, dane toksykokinetyczne uzyskane w badaniach zwierząt ciężarnych lub nieciężarnych, zakres przenoszenia w trakcie laktacji i szacunki dotyczące narażenia ludzi. Jeżeli dostępne są dane toksykokinetyczne, które wskazują na zależne od dawki nasycenie procesów toksykokinetycznych, należy zachować ostrożność w celu uniknięcia wysokich dawek, które wyraźnie wskazują na nasycenie, oczywiście pod warunkiem że oczekuje się narażenia ludzi na poziomie znacznie niższym od punktu nasycenia. W takich przypadkach najwyższa dawka powinna odpowiadać punktowi przegięcia lub nieco przewyższać ten punkt w odniesieniu do przejścia na nielinearne zachowanie toksykokinetyczne.

21. W przypadku braku istotnych danych toksykokinetycznych dawki należy ustalać w oparciu o efekty toksyczne, chyba że są one ograniczone fizykochemicznymi właściwościami badanej substancji chemicznej. Jeżeli dawki określono na podstawie toksyczności, należy wybrać najwyższą dawkę w celu wywołania pewnej toksyczności ogólnoustrojowej, ale nie śmierci ani poważnego cierpienia zwierząt.

22. Należy dobrać malejącą sekwencję dawek w celu wykazania wszelkich zależności dawka-odpowiedź i ustalenia poziomów NOAEL lub dawek bliskich granicy wykrywalności, które pozwoliłyby określić dawkę wyznaczającą dla najbardziej wrażliwych punktów końcowych. Aby uniknąć dużych odstępów w podawaniu dawek między poziomami NOAEL i LOAEL, optymalne są często podwójne lub poczwórne odstępy. Dodanie czwartej grupy badanej jest często bardziej zalecane niż stosowanie bardzo dużych odstępów (np. współczynnik większy od 10) między dawkami.

23. Z wyjątkiem poddawania działaniu badanej substancji chemicznej zwierzęta w grupie kontrolnej traktuje się w identyczny sposób jak zwierzęta w grupie badanej. Grupa ta powinna stanowić grupę, której substancja nie jest podawana, lub grupę kontrolną poddaną terapii pozorowanej bądź grupę kontrolną nośnika, jeżeli przy podawaniu badanej substancji chemicznej stosowany jest nośnik. Jeżeli w badaniu używa się nośnika, grupa kontrolna powinna otrzymać największą zastosowaną objętość nośnika.

Badanie graniczne

24. Jeżeli badania toksyczności dawki powtórzonej nie dają objawów toksyczności przy dawce co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dobę lub jeżeli nie przewiduje się objawów toksyczności na podstawie danych dotyczących substancji chemicznych powiązanych strukturalnie lub metabolicznie, wskazujących na podobieństwo w właściwościach metabolicznych *in vivo*/*in vitro*, badanie obejmujące kilka dawek może nie być konieczne. W takich przypadkach rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia można przeprowadzić z wykorzystaniem grupy kontrolnej i pojedynczej dawki wynoszącej co najmniej 1 000 mg/kg masy ciała/dobę. Gdyby jednak przy tej dawce granicznej uzyskano dowody na toksyczność rozrodczą lub rozwojową, wymagane byłoby przeprowadzenie dalszych badań przy niższych dawkach w celu zidentyfikowania poziomu NOAEL. Czynniki związane z badaniem granicznym mają zastosowanie wyłącznie wówczas, gdy narażenie ludzi nie wskazuje na konieczność zastosowania wyższej dawki.

PROCEDURY

Narażenie potomstwa

25. Narażenie na działanie substancji w paszy jest preferowaną metodą podawania. Jeżeli prowadzi się badania z wykorzystaniem sondy, należy pamiętać, że młode zwykle będą otrzymywały badaną substancję chemiczną tylko pośrednio przez mleko do momentu, aż rozpocznie się dawkowanie bezpośrednie po odsadzeniu. W badaniach, w których substancje podaje się z paszą lub wodą pitną, młode dodatkowo będą otrzymywały badaną substancję chemiczną bezpośrednio, gdy rozpoczną samodzielne odżywianie się w ostatnim tygodniu okresu laktacji. Należy rozważyć zmiany w projekcie badania, jeżeli wydzielanie badanej substancji chemicznej w mleku jest niewielkie oraz w przypadku braku dowodu na ciągłe narażenie potomstwa na działanie substancji. W takich przypadkach należy rozważyć bezpośrednie podawanie młodym dawki w okresie laktacji na podstawie dostępnych informacji toksykokinetycznych, toksyczności potomstwa lub zmian w biomarkerach (3)(4). Przed przeprowadzeniem badań polegających na bezpośrednim podawaniu dawek młodym pozostającym pod opieką matki należy starannie rozważyć korzyści i wady takiego rozwiązania (5).

Schemat dawkowania i podawanie dawek

26. Niektóre informacje na temat cyklów estrogenowych, histopatologii męskiego i żeńskiego układu rozrodczego oraz analizy plemników w jądrach/najądrzach można uzyskać z wcześniejszych badań toksyczności dawki powtórzonej trwających przez odpowiedni czas. Czas trwania podawania substancji w okresie poprzedzającym krycie w ramach rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia ma zatem na celu wykrycie wpływu na zmiany funkcjonalne, które mogą wpływać na zachowania kopulacyjne i zapłodnienie. Podawanie w okresie poprzedzającym krycie powinno być na tyle długie, aby osiągnąć stałe warunki narażenia u samców i samic z pokolenia P. W większości przypadków dwutygodniowe podawanie substancji w okresie poprzedzającym krycie uważa się za wystarczające dla obu płci. W przypadku samic taki okres obejmuje 3–4 pełne cykle estrogenowe i powinien być wystarczający, aby wykryć wszelkie niepożądane skutki dla cykliczności. W przypadku samców okres taki odpowiada czasowi, jaki jest wymagany do transportu dojrzewających plemników przez najądrza, i powinien pozwolić na wykrycie oddziaływania na plemniki po opuszczeniu jąder (w trakcie końcowych etapów spermiacji i dojrzewania plemników w najądrzach) podczas krycia. W momencie zakończenia badania, gdy planowana jest histopatologia jąder i najądrzy oraz analiza parametrów plemników, samce z pokolenia P i F_1 będą poddane działaniu substancji przez co najmniej jeden pełny cykl spermatogeniczny ((6)(7)(8)(9) i wytyczna OECD nr 151 (40)).

27. Scenariusze narażenia na substancje w okresie poprzedzającym krycie, dotyczące samców, mogłyby zostać dostosowane, gdyby toksyczność w odniesieniu do jąder (upośledzenie spermatogenezy) lub wpływ na integralność plemników i ich funkcjonowanie zostały wyraźnie zidentyfikowane w trakcie wcześniejszych badań. Podobnie w przypadku samic znany wpływ badanej substancji chemicznej na cykl estrogenowy, a co za tym idzie na receptywność seksualną, może uzasadnić odmienne scenariusze narażenia na działanie substancji w okresie poprzedzającym krycie. W szczególnych przypadkach dopuszczalne może być rozpoczęcie podawania substancji samicom z pokolenia P dopiero po uzyskaniu rozmazu zawierającego plemniki (zob. wytyczna OECD nr 151 (40)).

28. Po ustaleniu okresu dawkowania w okresie poprzedzającym krycie badaną substancję chemiczną należy podawać zwierzętom stale przez 7 dni w tygodniu aż do sekcji. Substancję należy podawać wszystkim zwierzętom przy użyciu tej samej metody. Dawkowanie należy kontynuować w dwutygodniowym okresie krycia oraz, w przypadku samic z pokolenia P, przez cały okres ciąży i laktacji aż do dnia zakończenia badania po odsadzeniu. Samcom należy podawać substancję w taki sam sposób aż do zakończenia badania w momencie odsadzenia zwierząt z pokolenia F_1. W przypadku sekcji pierwszeństwo powinny mieć samice, które należy poddać sekcji w tym

samym/podobnym dniu laktacji. Sekcję samców można rozłożyć na większą liczbę dni w zależności od możliwości laboratorium. Bezpośrednie podawanie dawki samcom i samicom z pokolenia F_1 powinno rozpocząć się w momencie odsadzenia i powinno trwać aż do zaplanowanej sekcji, w zależności od przydziału do danej kohorty, chyba że dawkowanie rozpoczęło się już w okresie laktacji.

29. W przypadku substancji chemicznych podawanych z paszą lub wodą pitną należy dopilnować, aby ilości podawanej badanej substancji chemicznej nie zakłócały zwykłego odżywiania lub równowagi wodnej. Jeżeli badana substancja chemiczna podawana jest z paszą, można zastosować stałe stężenie w paszy (ppm) lub stałą dawkę w odniesieniu do masy ciała zwierzęcia; należy określić wybrany wariant.

30. W przypadku podawania badanej substancji chemicznej przez sondę ilość podawanego jednorazowo płynu nie powinna zazwyczaj przekraczać 1 ml/100 g masy ciała (0,4 ml/100 g masy ciała stanowi maksymalną ilość w przypadku oleju, np. oleju kukurydzianego). Z wyjątkiem substancji chemicznych o działaniu drażniącym lub żrącym, które zwykle nasila się w wyższych stężeniach, należy minimalizować zmienność objętości badanej substancji dzięki korygowaniu stężenia w celu zapewnienia stałej objętości przy wszystkich dawkach. Substancję należy podawać o podobnej porze każdego dnia. Dawkę podawaną każdemu zwierzęciu należy zwykle określać na podstawie ostatniego pomiaru indywidualnej masy ciała i dostosowywać co najmniej raz w tygodniu w przypadku dorosłych samców i dorosłych niecięża rnych samic oraz co dwa dni w przypadku ciężarnych samic i zwierząt z pokolenia F_1, jeżeli dawkę podaje się przed odsadzeniem i przez 2 tygodnie po odsadzeniu. Jeżeli dane toksykokinetyczne wskazują na niskie przenikanie badanej substancji chemicznej przez łożysko, dawka podawana przez sondę w ostatnim tygodniu ciąży może wymagać dostosowania w celu uniknięcia podania matce nadmiernie toksycznej dawki. W dniu porodu samicom nie należy podawać substancji przez sondę ani żadną inną drogą podania wymagającą opieki nad zwierzęciem; pominięcie podania badanej substancji chemicznej w tym dniu jest preferowane w celu uniknięcia zakłócenia procesu porodu.

Krycie

31. Każdą samicę z pokolenia P należy umieścić z jednym, losowo wybranym i niespokrewnionym z nią samcem z tej samej grupy dawkowania (kojarzenie 1:1) aż do momentu zaobserwowania, że nastąpiła kopulacja, lub na okres 2 tygodni. Jeżeli liczba samców jest niewystarczająca, na przykład na skutek śmierci samców przed kojarzeniem, wówczas można kojarzyć samca lub samce, które już pokryły jedną samicę (1:1), z kolejną samicą lub kolejnymi samicami, tak aby wszystkie samice zostały skojarzone. Dzień 0 ciąży określa się jako dzień, w którym potwierdzono wystąpienie krycia (wykrycie w pochwie czopu nasienia lub plemników). Po zaobserwowaniu, że nastąpiła kopulacja, zwierzęta należy jak najszybciej rozdzielić. Jeżeli po upływie 2 tygodni krycie nie nastąpi, zwierzęta należy rozdzielić bez kolejnej możliwości krycia. W danych należy dokładnie zidentyfikować kojarzone pary.

Liczebność miotu

32. W dniu 4 po urodzeniu liczebność każdego miotu można dostosować przez wyeliminowanie dodatkowych młodych za pomocą doboru losowego, aby uzyskać, w miarę możliwości, liczebność jednego miotu wynoszącą pięć samców i pięć samic. Selektywna eliminacja młodych, np. oparta na masie ciała, jest nieodpowiednia. Ilekroć liczba młodych samców lub samic uniemożliwia uzyskanie pięciu osobników każdej płci na miot, dopuszczalne jest częściowe dostosowanie (na przykład sześć samców i cztery samice).

Dobór młodych do badań w okresie poodsadzeniowym (zob. rys. 1)

33. W momencie odsadzenia (około dnia 21 po urodzeniu) spośród młodych z wszystkich dostępnych miotów wybiera się do 20 zwierząt na grupę dawkowania i grupę kontrolną w celu prowadzenia dalszych badań i utrzymuje aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej (chyba że wymagane są wcześniejsze badania). Młode dobiera się losowo, z wyjątkiem ewidentnie słabowitych osobników (zwierzęta o masie ciała o ponad dwa odchylenia standardowe niższej od średniej masy ciała młodego w danym miocie), których nie należy włączać do badania, ponieważ jest mało prawdopodobne, że będą one reprezentatywne dla grupy badanej.

W dniu 21 po urodzeniu wybrane młode z pokolenia F_1 przydziela się losowo do jednej z trzech kohort zwierząt w następujący sposób:

kohorta 1 (1A i 1B) = badanie toksyczności reprodukcyjnej/rozwojowej,

kohorta 2 (2A i 2B) = badanie neurotoksyczności rozwojowej,

kohorta 3 = badanie immunotoksyczności rozwojowej.

Kohorta 1A: jeden samiec i jedna samica/miot/grupę (20/płeć/grupę): dobór priorytetowy do celów podstawowej oceny wpływu na układy rozrodcze i oceny toksyczności ogólnej.

Kohorta 1B: jeden samiec i jedna samica/miot/grupę (20/płeć/grupę): dobór priorytetowy do celów oceny uzupełniającej zdolności reprodukcyjnej u zwierząt z pokolenia F_1 w okresie krycia, w momencie poddawania ocenie (zob. wytyczna OECD nr 117 (39)) oraz do celów uzyskania dodatkowych danych histopatologicznych w przypadkach substancji potencjalnie zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego lub hormonalnego, lub gdy wyniki z kohorty 1A są niejednoznaczne.

Kohorta 2A: łącznie 20 młodych na grupę (10 samców i 10 samic na grupę; jeden samiec lub jedna samica na miot) przydzielonych do badań neurobehawioralnych, a następnie poddanych ocenie neurohistopatologicznej jako osobniki dorosłe.

Kohorta 2B: łącznie 20 młodych na grupę (10 samców i 10 samic na grupę; jeden samiec lub jedna samica na miot) przydzielonych do oceny neurohistopatologicznej w momencie odsadzenia (dzień 21 po urodzeniu lub dzień 22 po urodzeniu). W przypadku niewystarczającej liczby zwierząt preferuje się przydzielenie zwierząt do kohorty 2A.

Kohorta 3: łącznie 20 młodych na grupę (10 samców i 10 samic na grupę; jedno na miot, w miarę możliwości). Wymagane mogą być dodatkowe młode z grupy kontrolnej jako zwierzęta kontrolne dodatnie w teście reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T w dniu 56 ± 3 po urodzeniu.

34. Gdyby liczba młodych w miocie okazała się niewystarczająca, aby zapełnić wszystkie kohorty, pierwszeństwo przysługuje kohorcie 1, ponieważ można ją rozszerzyć w celu utworzenia pokolenia F_2. W przypadku szczególnych wątpliwości, np. jeżeli podejrzewa się, że substancja chemiczna jest substancją o działaniu neurotoksycznym, immunotoksycznym lub zaburzającą funkcjonowanie układu rozrodczego, do każdej z kohort można przydzielić dodatkowe młode. Takie młode można wykorzystać do badań w różnych punktach czasowych lub do oceny uzupełniających punktów końcowych. Młode nieprzydzielone do kohort zostaną poddane biochemii klinicznej (pkt 55) i pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu (pkt 68).

Drugie krycie zwierząt z pokolenia P

35. W przypadku zwierząt z pokolenia P zwykle nie zaleca się drugiego krycia, ponieważ odbywałoby się ono kosztem utraty ważnych informacji na temat liczby obszarów zagnieżdżenia (i w związku z tym danych dotyczących straty poimplementacyjnej i okołoporodowej, będących wskaźnikami możliwego potencjału teratogennego) w odniesieniu do pierwszego miotu. Z punktu widzenia konieczności weryfikacji lub wyjaśnienia wpływu na samice poddane działaniu substancji odpowiedniejsze byłoby rozszerzenie badania w taki sposób, aby obejmowało ono krycie pokolenia F_1. Drugie krycie samców z pokolenia P z samicami niepoddanymi działaniu substancji zawsze stanowi jednak rozwiązanie pozwalające wyjaśnić niejednoznaczne wyniki lub może służyć do dalszej charakterystyki wpływu na płodność zaobserwowanego w pierwszym kryciu.

OBSERWACJE NA ŻYWYCH ZWIERZĘTACH

Obserwacje kliniczne

36. Ogólną obserwację kliniczną zwierząt z pokolenia P i wybranych zwierząt z pokolenia F_1 przeprowadza się raz dziennie. W przypadku dawkowania przez sondę obserwacje kliniczne należy przeprowadzać przed rozpoczęciem i po zakończeniu dawkowania (w celu wykrycia możliwych oznak toksyczności związanych z najwyższym stężeniem w osoczu). Rejestruje się mające związek z badaniem zmiany w zachowaniu, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie oznaki toksyczności. Dwa razy dziennie, a w weekend raz dziennie, obserwuje się wszystkie zwierzęta pod kątem ostrej toksyczności, zachorowalności i śmiertelności.

37. Ponadto co tydzień przeprowadza się bardziej szczegółowe badanie wszystkich zwierząt z pokoleń P i F_1 (po odsadzeniu) i najlepiej byłoby je przeprowadzać przy okazji ważenia zwierzęcia, co zminimalizowałoby jego stres związany z tymi działaniami. Należy starannie prowadzić obserwacje i rejestrować ich wyniki za pomocą systemu punktowego określonego przez dane laboratorium badawcze. Należy dołożyć starań, aby różnice w warunkach badania były minimalne. Odnotowane objawy powinny obejmować między innymi zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego (np. łzawienie, piloreksja, rozmiar źrenicy, zmieniony rytm oddychania). Należy także rejestrować zmiany w sposobie chodzenia, postawie, reakcji na kontakt, a także obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, stereotypii (np. nadmiernego czyszczenia się, powtarzanego kręcenia się) lub dziwnych zachowań (np. samookaleczania, chodzenia do tyłu).

Masa ciała i spożycie pokarmu/wody

38. Osobniki z pokolenia P waży się w pierwszym dniu dawkowania, a potem co najmniej raz w tygodniu. Ponadto samice z pokolenia P waży się w okresie laktacji w tych samych dniach, w których odbywa się ważenie młodych z ich miotów (zob. pkt 44). Wszystkie zwierzęta z pokolenia F_1 waży się osobno przy odsadzeniu (dzień 21 po urodzeniu), a potem co najmniej raz w tygodniu. Masę ciała rejestruje się także w dniu, w którym zwierzęta osiągną dojrzałość płciową (dzień pełnego oddzielenia napletka lub otwarcia pochwy). Wszystkie zwierzęta waży się przy uśmierceniu.

39. W trakcie badania spożycie pokarmu i wody (w przypadku podawania badanej substancji chemicznej w wodzie pitnej) rejestruje się co najmniej raz w tygodniu w tych samych dniach, w których dokonuje się pomiaru masy ciała zwierząt (z wyłączeniem okresu wspólnego przebywania w klatce). Spożycie pokarmu przez osobniki z pokolenia F_1 z każdej klatki rejestruje się co tydzień, począwszy od doboru zwierząt do poszczególnych kohort.

Cykle estrogenowe

40. Wstępne informacje na temat wpływu badanej substancji chemicznej na cykl estrogenowy mogą być już dostępne z poprzednich badań toksyczności dawki powtórzonej i można je wykorzystać przy opracowywaniu protokołu dla badanej substancji chemicznej w odniesieniu do rozszerzonego badania toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia. Zazwyczaj ocena cykliczności estrogenowej (za pomocą cytologii pochwy) rozpoczyna się na początku okresu podawania substancji i trwa do uzyskania potwierdzenia, że nastąpiło krycie, lub do zakończenia dwutygodniowego okresu krycia. Jeżeli samice zostały zbadane pod kątem zwykłych cykli estrogenowych przed podaniem substancji, wówczas przydatne jest kontynuowanie pobierania wymazów po rozpoczęciu badania, ale jeżeli istnieje obawa o wystąpienie niespecyficznych skutków na początku podawania substancji (takich jak początkowy znaczny spadek spożycia pokarmu), wówczas można dać zwierzętom czas do dwóch tygodni na przystosowanie się do podawania przed rozpoczęciem dwutygodniowego okresu pobierania wymazów poprzedzającego kojarzenie. Jeżeli okres podawania substancji samicom został przedłużony w ten sposób (tj. do czterotygodniowego okresu podawania substancji przed okresem krycia), wówczas należy rozważyć nabycie młodszych osobników i wydłużenie okresu podawania substancji samcom przed kojarzeniem. Pobierając komórki z pochwy/szyjki, należy dołożyć wszelkich starań, aby uniknąć uszkodzenia błony śluzowej i, w następstwie, wywołania ciąży rzekomej (10)(11).

41. Wymazy z pochwy pochodzące od wszystkich samic z pokolenia F_1 w kohorcie 1A należy badać codziennie od momentu otwarcia pochwy aż do zarejestrowania pierwszego wymazu zawierającego komórki zrogowaciałe w celu określenia odstępu czasowego między tymi dwoma zdarzeniami. Należy również monitorować cykle estrogenowe u wszystkich samic z pokolenia F_1 w kohorcie 1A przez okres dwóch tygodni, począwszy od około dnia 75 po urodzeniu. Ponadto, w przypadku konieczności krycia osobników z pokolenia F_1, cytologię pochwy samic z kohorty 1B wykonuje się od momentu kojarzenia aż do uzyskania potwierdzenia, że nastąpiło krycie.

Krycie i ciąża

42. Oprócz standardowych punktów końcowych (np. masa ciała, spożycie pokarmu, obserwacje kliniczne obejmujące kontrole śmiertelności/zachorowalności) rejestruje się daty kojarzenia, datę inseminacji i datę porodu oraz oblicza się przerwę w kopulacji (od momentu kojarzenia do inseminacji) i okres ciąży (od momentu inseminacji do porodu). W czasie przewidywanego porodu należy uważnie zbadać samice z pokolenia P pod kątem jakichkolwiek objawów dystocji. Należy rejestrować wszelkie nietypowe zachowania związane z budową gniazda i opieką.

43. Dzień, w którym następuje poród, jest jednocześnie dniem 0 laktacji dla matki i dniem 0 po urodzeniu dla potomstwa. Ewentualnie podstawą wszystkich porównań może być również czas po kopulacji, aby uniknąć pomylenia danych dotyczących rozwoju pourodzeniowego, które są spowodowane różnicami w czasie trwania ciąży, należy jednak również zarejestrować czas związany z porodem. Jest to niezwykle ważne w przypadku, gdy badana substancja chemiczna wywiera wpływ na czas trwania ciąży.

Parametry potomstwa

44. Każdy miot należy zbadać po porodzie tak szybko, jak to możliwe (w dniu 0 po urodzeniu lub w dniu 1), aby ustalić liczbę młodych i ich płeć, martwe urodzenia, żywe urodzenia i obecność wyraźnych anomalii (widoczne z zewnątrz nieprawidłowości, w tym rozszczep podniebienia, krwotok podskórny, nietypowy kolor skóry lub nietypowa tekstura skóry, obecność pępowiny, brak mleka w żołądku, obecność suchych wydzielin). Ponadto pierwsze badanie kliniczne noworodków powinna obejmować ocenę jakościową temperatury ciała, stanu ich aktywności i reakcji na kontakt. Młode, które zmarły w dniu 0 po urodzeniu lub później, powinny zostać zbadane pod kątem możliwych wad i przyczyny śmierci. Żywe młode są liczone i ważone oddzielnie w dniu 0 lub 1 po urodzeniu, a następnie regularnie, np. co najmniej w dniach 4, 7, 14 i 21 po urodzeniu. Badania kliniczne, stosowne do wieku zwierząt, należy powtarzać przy ważeniu zwierząt lub częściej, jeżeli przy urodzeniu poczyniono szczególne

ustalenia dla danego przypadku. Odnotowane objawy mogą między innymi obejmować nieprawidłowości zewnętrze, zmiany w skórze, sierści, oczach, błonach śluzowych, wystąpienie wydzielin i wydalin oraz aktywność autonomicznej części układu nerwowego. Należy także zarejestrować zmiany w sposobie chodzenia, postawie, reakcji na kontakt oraz obecność ruchów klonicznych lub tonicznych, stereotypii lub dziwnych zachowań.

45. Pomiar odległości anogenitalnej u każdego młodego należy przeprowadzić co najmniej raz między dniem 0 a dniem 4 po urodzeniu. W dniu pomiaru odległości anogenitalnej należy dokonać pomiaru masy ciała młodego, a odległość anogenitalną należy znormalizować w odniesieniu do pomiaru wielkości młodego, najlepiej jako pierwiastek kwadratowy z masy ciała (12). W dniu 12 lub 13 po urodzeniu należy skontrolować obecność brodawek sutkowych/otoczek brodawek sutkowych u młodych samców.

46. Wszystkie wybrane osobniki z pokolenia F_1 bada się codziennie pod kątem oddzielenia napletka u samców lub otwarcia pochwy u samic, rozpoczynając przed przewidywanym dniem wystąpienia tych punktów końcowych, tak aby wykryć przypadki wcześniejszego osiągnięcia dojrzałości płciowej. Należy odnotować wszelkie nieprawidłowości narządów układu rozrodczego, takie jak trwała przegroda pochwy, spodziectwo lub żołądź rozszczepiona. Dojrzałość płciową osobników z pokolenia F_1 porównuje się z rozwojem fizycznym, określając wiek i masę ciała w momencie oddzielenia napletka u samców lub otwarcia pochwy u samic (13).

Ocena potencjalnej neurotoksyczności rozwojowej (kohorty 2A i 2B)

47. Do oceny neurotoksyczności należy wykorzystać 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 2A oraz 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 2B z każdej grupy badanej (w odniesieniu do każdej kohorty: 1 samiec i 1 samica na miot; wszystkie mioty są reprezentowane przez co najmniej jedno młode; dobór losowy). Zwierzęta z kohorty 2A należy poddać ocenie reakcji na nagły dźwięk, zestawowi badań funkcjonalno-obserwacyjnych, ocenie aktywności ruchowej (zob. pkt 48–50) i ocenie neuropatologicznej (zob. pkt 74–75). Należy dołożyć starań, aby różnice we wszystkich warunkach badania były minimalne i niepowiązane systematycznie z podawaniem. Do zmiennych, które mogą wpłynąć na zachowanie, należą: poziom dźwięku (np. przerywany hałas), temperatura, wilgotność, oświetlenie, zapachy, pora dnia i zakłócenia środowiskowe. Wyniki testów neurotoksyczności należy interpretować w odniesieniu do odpowiednich historycznych zakresów referncyjnych kontroli. Zwierzęta z kohorty 2B należy wykorzystać do oceny neuropatologicznej w dniu 21 lub 22 po urodzeniu (zob. pkt 74–75).

48. W dniu 24 po urodzeniu (± 1 dzień) należy przeprowadzić badanie reakcji na nagły dźwięk, wykorzystując zwierzęta z kohorty 2A. Dzień badania powinien być równomiernie podzielony między grupy badane i grupy kontrolne. Każda sesja składa się z 50 prób. Przy przeprowadzaniu badania reakcji na nagły dźwięk należy ustalić średnią amplitudę reakcji dla każdego bloku obejmującego 10 prób (5 bloków po 10 prób), przy czym warunki badania optymalizuje się, aby uzyskać habituację w trakcie jednej sesji. Opisywane procedury powinny być spójne z metodą badawczą B.53 (35).

49. W odpowiednim czasie między dniem 63 a 75 po urodzeniu zwierzęta z kohorty 2A poddaje się zestawowi badań funkcjonalno-obserwacyjnych i automatycznemu badaniu aktywności ruchowej. Procedury te powinny być spójne z metodami badawczymi B.43 (33) i B.53 (35). Zestaw badań funkcjonalno-obserwacyjnych obejmuje dogłębny opis wyglądu zewnętrznego podmiotu, jego zachowań i integralności funkcjonalnej. Ocenę taką uzyskuje się przez obserwacje zwierząt w klatkach macierzystych, obserwacje zwierząt po przeniesieniu na znormalizowaną powierzchnię do obserwacji (otwartą przestrzeń), gdzie zwierzęta mogą się swobodnie poruszać, i przez badania manipulacyjne. Badania powinno się przeprowadzać w kolejności od najmniej do najbardziej interaktywnych. Wykaz pomiarów przedstawiono w dodatku 1. Obserwacje wszystkich zwierząt powinni prowadzić wyszkoleni obserwatorzy, którzy nie mają wiedzy na temat tego, czy zwierzętom podawana jest substancja, i którzy stosują standardowe procedury w celu ograniczenia do minimum zmienności między obserwatorami. Zaleca się, aby w miarę możliwości ten sam obserwator przeprowadzał oceny zwierząt w ramach danego badania. Jeżeli nie jest to możliwe, wymagane jest udowodnienie wiarygodności ocen między obserwatorami. W odniesieniu do każdego parametru z zestawu badań behawioralnych należy stosować wyraźnie określone zakresy operacyjne i kryteria przyznawania punktów. W miarę możliwości należy opracować obiektywne pomiary ilościowe w odniesieniu do obserwowanych punktów końcowych, które obejmują klasyfikację subiektywną. Każde zwierzę jest badane oddzielnie pod kątem aktywności ruchowej. Sesja badawcza powinna być na tyle długa, aby wykazać w jej trakcie habituację grup kontrolnych. Należy monitorować aktywność ruchową za pomocą automatycznego sprzętu do rejestrowania aktywności, który powinien być w stanie wykryć zarówno wzrost, jak i obniżenie aktywności (tj. podstawowy poziom aktywności mierzony przez urządzenie nie powinien być tak niski, aby uniemożliwić wykrycie obniżenia aktywności, ani tak wysoki, aby uniemożliwić wykrycie jej wzrostu). Każde urządzenie powinno zostać przetestowane w ramach standardowych procedur, aby zapewnić na ile to tylko możliwe niezawodność działania poszczególnych urządzeń w poszczególnych dniach. Na ile to możliwe grupy badane powinny zostać przydzielone równomiernie do poszczególnych urządzeń. Należy równomiernie dostosować grupy badane do pór badania, aby uniknąć zakłócenia wywołanego okołodobowym rytmem aktywności biologicznej.

50. Jeżeli istniejące informacje wskazują na potrzebę przeprowadzenia innych badań funkcjonalnych (np. sensorycznych, społecznych, poznawczych), należy je włączyć do badań, nie naruszając integralności pozostałych ocen przeprowadzanych w ramach badania. Jeżeli badania te przeprowadza się na tych samych zwierzętach, które wykorzystano do badania reakcji na nagły dźwięk, zestawu badań funkcjonalno-obserwacyjnych i badań aktywności ruchowej, wówczas należy zaplanować różne badania, aby zminimalizować ryzyko naruszenia integralności

tych badań. Procedury uzupełniające mogą być szczególnie użyteczne w przypadkach, gdy obserwacje empiryczne, przewidywane skutki lub mechanizm/sposób działania wskazują na jakiś szczególny rodzaj neurotoksyczności.

Ocena potencjalnej immunotoksyczności rozwojowej (kohorta 3)

51. W dniu 56 po urodzeniu (± 3 dni) 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 3 z każdej grupy badanej (1 samiec lub 1 samica na miot; wszystkie mioty reprezentuje co najmniej jedno młode; dobór losowy) należy poddać testowi reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T, tj. reakcji pierwszorzędowych przeciwciał IgM na antygen zależny od limfocytów T, np. erytrocyty owcy (SRBC) lub hemocyjanina ślimaka morskiego (KLH), zgodnie z aktualnymi procedurami badawczymi dotyczącymi immunotoksyczności (14)(15). Reakcję można ocenić, licząc swoiste komórki tworzące łysinki w śledzionie lub ustalając miano przeciwciał IgM swoistych dla SRBC lub KLH w surowicy za pomocą testu ELISA w szczytowym momencie reakcji. Reakcje zwykle osiągają moment szczytowy w czwartym (w przypadku reakcji komórek tworzących łysinki) lub piątym (w przypadku testu ELISA) dniu po immunizacji drogą dożylną. Jeżeli reakcję przeciwciała pierwszorzędowego bada się, licząc komórki tworzące łysinki, dopuszcza się ocenę podgrup zwierząt w odrębne dni, pod warunkiem że: immunizacja i uśmiercanie podgrupy przebiegają w wyznaczonym czasie, dzięki czemu komórki tworzące łysinki są liczone w szczytowym momencie reakcji; że podgrupy składają się z równej liczby samców i samic z potomstwa ze wszystkich grup dawkowania, w tym grup kontrolnych; oraz że podgrupy ocenia się w mniej więcej tym samym wieku pourodzeniowym.Poddawanie działaniu badanej substancji chemicznej będzie kontynuowane aż do dnia poprzedzającego pobranie śledzion na potrzeby badania reakcji komórek tworzących łysinki lub surowicy do testu ELISA.

Ocena uzupełniająca potencjalnej toksyczności reprodukcyjnej (kohorta 1B)

52. Zwierzęta z kohorty 1B mogą być dalej objęte podawaniem po dniu 90 po urodzeniu i hodowane w celu uzyskania pokolenia F_2, jeżeli jest to konieczne. Samce i samice z tej samej grupy dawkowania powinny być trzymane razem (ale należy unikać kojarzenia rodzeństwa) przez okres do dwóch tygodni, który należy rozpocząć najwcześniej w dniu 90 po urodzeniu, ale nie później niż w dniu 120 po urodzeniu. Procedury powinny być podobne do tych dotyczących zwierząt z pokolenia P. Na podstawie wagi dowodów wystarczające może być jednak uśmiercenie miotów w dniu 4 po urodzeniu, zamiast ich hodowania do odsadzenia lub dłużej.

OBSERWACJE NA KONIEC BADANIA

Biochemia kliniczna/hematologia

53. Należy monitorować skutki ogólnoustrojowe u zwierząt z pokolenia P. Próbki krwi pobiera się na czczo z określonego miejsca od dziesięciu losowo dobranych samców i samic z pokolenia P na grupę dawkowania na koniec badania, przechowuje się w odpowiednich warunkach i poddaje częściowej lub całkowitej hematologii, biochemii klinicznej, testowi na T4 i TSH lub innym badaniom sugerowanym przez znany profil skutków badanej substancji chemicznej (zob. dokument zawierający wytyczne OECD nr 151 (40)). Należy zbadać następujące parametry hematologiczne: hematokryt, stężenie hemoglobiny, liczbę erytrocytów, liczbę leukocytów i różnicowanie leukocytów, liczbę płytek krwi i czas krzepnięcia krwi/potencjał krzepliwości. Badania osocza lub surowicy powinny obejmować: cukier, cholesterol całkowity, mocznik, kreatyninę, białko całkowite, albuminę i co najmniej dwa enzymy wskazujące na stan komórek wątroby (takie jak aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa, fosfataza alkaliczna, gamma-glutamylotranspeptydaza i dehydrogenaza sorbitolu). Pomiary dodatkowych enzymów i kwasów żółciowych mogą w pewnych okolicznościach dostarczyć przydatnych informacji. Ponadto można pobrać krew od wszystkich zwierząt i przechowywać ją do możliwej analizy w późniejszym terminie, aby pomóc rozwiać wątpliwości w przypadku uzyskania niejednoznacznych wyników lub wygenerować dane dotyczące narażenia wewnętrznego. Jeżeli nie planuje się drugiego krycia zwierząt z pokolenia P, pobiera się próbki krwi tuż przed procedurą lub w ramach zaplanowanego uśmiercenia. W przypadku zachowania zwierząt próbki krwi należy pobrać kilka dni przed drugim kryciem zwierząt. O ile istniejące dane pochodzące z badań toksykologicznych dawki powtórzonej nie wskazują, że badana substancja chemiczna nie ma wpływu na parametr, przed uśmierceniem należy przeprowadzić badanie moczu oraz ocenić następujące parametry: wygląd zewnętrzny, objętość, osmolalność lub masę właściwą, pH, białko, cukier, krew i krwinki, szczątki komórek. Mocz można także pobierać w celu monitorowania wydalania badanej substancji chemicznej lub jej metabolitów.

54. Skutki ogólnoustrojowe należy również monitorować u zwierząt z pokolenia F_1. Próbki krwi pobiera się na czczo z określonego miejsca od dziesięciu losowo dobranych samców i samic z kohorty 1A na grupę dawkowania na koniec badań, przechowuje się w odpowiednich warunkach i poddaje standardowej biochemii klinicznej, w tym ocenie poziomów surowicy w odniesieniu do hormonów tarczycy (T4 i TSH), hematologii (liczba leukocytów i różnicowanie leukocytów oraz liczba erytrocytów) oraz badaniu moczu.

55. W dniu 4 po urodzeniu młode nieprzydzielone do żadnej kohorty obejmuje się pełnym rozpoznaniem histopatologicznym oraz rozważa się pomiar stężeń hormonu tarczycy (T4) w surowicy. W razie potrzeby krew noworodków (w dniu 4 po urodzeniu) można łączyć według miotów na potrzeby analizy biochemicznej/hormonu tarczycy. Krew pobiera się także do celów analizy T4 i TSH od osobników odsadzanych objętych pełnym rozpoznaniem histopatologicznym w dniu 22 po urodzeniu (młode z pokolenia F_1, których nie dobrano do kohort).

Parametry plemników

56. Parametry plemników należy mierzyć u wszystkich samców z pokolenia P, chyba że istnieją dane wykazujące, że parametry plemników nie uległy zmianom w trakcie 90-dniowego badania. Badanie parametrów plemników należy przeprowadzić u wszystkich samców z kohorty 1A.

57. Na koniec badania rejestruje się masy jąder i najądrzy wszystkich samców z pokoleń P i F_1 (z kohorty 1A). Zachowuje się przynajmniej jedno jądro i jedno najądrze do badania histopatologicznego. Pozostałe najądrza wykorzystuje się do oznaczenia liczby zapasów plemników w ogonie najądrzy (16)(17). Ponadto pobiera się plemniki z ogona najądrzy (lub nasieniowodu) za pomocą metod, które minimalizują szkody w odniesieniu do oceny ruchliwości plemników i ich morfologii (18).

58. Ruchliwość plemników można oceniać natychmiast po uśmierceniu albo można ją zarejestrować do dalszej analizy. Udział procentowy poruszających się postępowo plemników powinien zostać oceniony subiektywnie albo obiektywnie za pomocą wspomaganej komputerowo analizy ruchu (19)(20)(21)(22)(23)(24). Do celów oceny morfologii plemników należy zbadać próbkę plemników pochodzących z najądrza (lub nasieniowodu) w formie utrwalonych lub mokrych preparatów (25) i co najmniej 200 plemników na próbkę należy sklasyfikować jako prawidłowe (zarówno główka, jak i wstawka/część główna wici wydają się prawidłowe) lub nieprawidłowe. Przykłady nieprawidłowości morfologicznych plemników obejmują zrośnięcie, oddzielone główki i zniekształcone główki lub wici (26). Zniekształcone lub duże główki plemników mogą wskazywać na nieprawidłowości w spermiacji.

59. Jeżeli próbki plemników zostały zamrożone, wymazy utrwalone, a obrazy na potrzeby analizy ruchliwości plemników zarejestrowane w trakcie sekcji (27), późniejsze analizy można ograniczyć do grupy kontrolnej i samców otrzymujących wysoką dawkę. Jeżeli jednak odnotowuje się skutki związane z podawaniem, należy ocenić również grupy otrzymujące niższe dawki.

Pełne rozpoznanie histopatologiczne

60. W momencie uśmiercenia lub przedwczesnej śmierci wszystkie zwierzęta z pokoleń P i F_1 poddaje się sekcji i badaniu makroskopowemu pod kątem jakichkolwiek nieprawidłowości strukturalnych lub zmian patologicznych. Szczególną uwagę należy zwrócić na organy układu rozrodczego. Młode, które uśmiercono w sposób humanitarny, gdy były w stanie agonalnym, i martwe młode należy zarejestrować oraz, jeżeli nie zostały zmacerowane, zbadać je pod kątem możliwych wad lub przyczyny śmierci, a następnie zachować.

61. W dniu przeprowadzania sekcji bada się wymazy z pochwy pochodzące od dorosłych samic z pokoleń P i F_1 w celu określenia stadium cyklu estrogenowego i umożliwienia korelacji z histopatologią narządów rozrodczych. Macice wszystkich samic z pokolenia P (i samic z pokolenia F_1 w stosownych przypadkach) bada się na obecność i liczbę zagnieżdżonych płodów w sposób, który nie zaburza oceny histopatologicznej.

Masa narządów i konserwacja tkanek — dorosłe zwierzęta z pokolenia P i F_1

62. W momencie uśmiercenia określa się masy ciała i mokre masy narządów wymienionych poniżej pochodzące od wszystkich zwierząt z pokolenia P i od wszystkich dorosłych z pokolenia F_1 z odpowiednich kohort (jak określono poniżej) możliwie najszybciej po sekcji, aby uniknąć wysuszenia. Następnie należy zakonserwować te narządy w odpowiednich warunkach. O ile nie określono inaczej, narządy parzyste należy ważyć oddzielnie lub razem zgodnie z typową praktyką stosowaną przez dane laboratorium:

— macica (razem z jajowodami i szyjką macicy), jajniki,

— jądra, najądrza (całe i ogon najądrzy w przypadku próbek stosowanych do liczenia plemników),

— gruczoł krokowy (połączone części grzbietowo-boczne i brzuszne). Odcinając gruczoł krokowy, należy zachować ostrożność, aby uniknąć przebicia pęcherzyków nasiennych wypełnionych płynem. W przypadku wpływu podawania substancji na całkowitą masę gruczołu krokowego należy ostrożnie przeprowadzić sekcję segmentów grzbietowo-bocznych i brzusznych po utrwaleniu i zważyć je oddzielnie,

— pęcherzyki nasienne z gruczołami koagulującymi i ich płynami (jako całość),

— mózg, wątroba, nerki, serce, śledziona, grasica, przysadka, tarczyca (po utrwaleniu), nadnercze i znane narządy docelowe lub tkanki.

63. Oprócz wymienionych powyżej narządów należy zakonserwować w odpowiednich warunkach próbki nerwów obwodowych, mięśni, rdzenia kręgowego, oka i nerwu wzrokowego, przewodu pokarmowego, pęcherza moczowego, płuca, tchawicy (wraz z dołączonymi tarczycą i przytarczycami), szpiku kostnego, nasieniowodu (samce), gruczołu mlekowego (samce i samice) i pochwy.

64. Wszystkie narządy zwierząt z kohorty 1A są ważone i konserwowane na potrzeby histopatologii.

65. W celu zbadania powstałych przedurodzeniowych i pourodzeniowych skutków immunotoksycznych 10 samców i 10 samic spośród zwierząt z kohorty 1A z każdej grupy badanej (1 samiec lub 1 samica na miot; wszystkie mioty są reprezentowane przez co najmniej 1 młode; dobór losowy) będą objęte następującymi procedurami na koniec badania:

— ważenie węzłów chłonnych związanych i niezwiązanych z drogą narażenia (oprócz ważenia nadnerczy, grasicy i śledziony już przeprowadzonego u wszystkich zwierząt z kohorty 1A),

— analiza subpopulacji limfocytów śledziony (CD4+ oraz CD8+ limfocytów T, limfocytów B oraz i komórek NK) przy wykorzystaniu połowy śledziony, a druga połowa jest konserwowana w celu oceny histopatologicznej.

Analiza subpopulacji limfocytów śledziony u zwierząt nieuodpornionych (z kohorty 1A) pozwoli ustalić, czy narażenie jest związane z przesunięciem w immunologicznej dystrybucji w stanie równowagi grasicozależnych limfocytów pomocniczych (CD4+) lub cytotoksycznych (CD8+) lub komórek NK (szybka reakcja na komórki nowotworowe i patogeny).

66. U zwierząt z kohorty 1B należy zważyć następujące narządy, a odpowiadające im tkanki przetworzyć na bloczek:

— pochwę (niezważoną),

— macicę z szyjką,

— jajniki,

— jądra (co najmniej jedno),

— najądrza,

— pęcherzyki nasienne z gruczołami koagulującymi,

— gruczoł krokowy,

— przysadkę,

— zidentyfikowane narządy docelowe.

Histopatologii kohorty 1B dokonuje się, jeżeli wyniki badań przeprowadzonych na osobnikach z kohorty 1A są niejednoznaczne lub w przypadkach, gdy podejrzewa się występowanie substancji zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego lub hormonalnego.

67. Kohorty 2A i 2B: badanie neurotoksyczności rozwojowej (dzień 21 lub 22 po urodzeniu i dorosłe potomstwo). Zwierzęta z kohorty 2A są uśmiercane po przeprowadzeniu badań behawioralnych, przy czym rejestruje się masę mózgu i przeprowadza pełną neurohistopatologię do celów oceny neurotoksyczności. Zwierzęta z kohorty 2B są uśmiercane w dniu 21 lub 22 po urodzeniu, przy czym rejestruje się masę ich mózgu i przeprowadza badanie mikroskopowe mózgu do celów oceny neurotoksyczności. Utrwalenie perfuzyjne jest wymagane w odniesieniu do zwierząt z kohorty 2A i opcjonalne w odniesieniu do zwierząt z kohorty 2B, jak określono w metodzie badawczej B.53 (35).

Masa narządów i konserwacja tkanek — odsadzone zwierzęta z pokolenia F_1

68. Młode niedobrane do kohort, w tym słabowite młode, są uśmiercane po odsadzeniu w dniu 22 po urodzeniu, chyba że wyniki wskazują na potrzebę prowadzenia dalszych badań na żywych zwierzętach. Uśmiercone młode podlegają pełnemu rozpoznaniu histopatologicznemu, w tym ocenie narządów rozrodczych, jak opisano w pkt 62 i 63. Należy zważyć mózg, śledzionę i grasicę maksymalnie 10 młodych każdej płci z każdej grupy z możliwie największej liczby miotów oraz zachować je w odpowiednich warunkach. Ponadto można zakonserwować tkanki gruczołu mlekowego tych młodych samców i samic do celów dalszej analizy mikroskopowej ([1]) (zob. dokument zawierający wytyczne OECD nr 151 (40)). Należy zachować części wykazujące poważne nieprawidłowości oraz tkanki docelowe do możliwego badania histologicznego.

([1]) Badania wykazały, że gruczoł mlekowy, zwłaszcza na wczesnym stadium rozwoju, stanowi wrażliwy punkt końcowy działania estrogenów. Zaleca się, aby w opisywanej metodzie uwzględnić punkty końcowe obejmujące gruczoły mlekowe młodych obu płci przy walidacji.

Histopatologia — zwierzęta z pokolenia P

69. Pełną histopatologię narządów wymienionych w pkt 62 i 63 przeprowadza się w odniesieniu do wszystkich zwierząt z pokolenia P otrzymujących wysoką dawkę i tworzących grupę kontrolną. Należy również zbadać narządy wykazujące zmiany związane z podawaniem substancji u wszystkich zwierząt z grup przyjmujących niższą dawkę, aby pomóc w wyznaczeniu poziomu NOAEL. Ponadto należy objąć oceną histopatologiczną narządy rozrodcze wszystkich zwierząt, u których podejrzewa się obniżoną płodność, np. tych, u których nie doszło do krycia, nie zostały zapłodnione, nie spłodziły albo nie urodziły zdrowego potomstwa lub w przypadku których cykliczność estrogenowa lub liczba, ruchliwość lub morfologia plemników uległy zmianom, jak również wszystkie poważne zmiany patologiczne.

Histopatologia — zwierzęta z pokolenia F_1

Zwierzęta z kohorty 1

70. Pełną histopatologię narządów wymienionych w pkt 62 i 63 przeprowadza się w odniesieniu do wszystkich dorosłych osobników z kohorty 1A otrzymujących wysoką dawkę i tych tworzących grupę kontrolną. Wszystkie mioty powinny być reprezentowane przez co najmniej jedno młode na płeć. Należy również zbadać narządy i tkanki wykazujące zmiany związane z podawaniem oraz wszystkie poważne zmiany patologiczne u wszystkich zwierząt z grup otrzymujących niższe dawki, aby pomóc w wyznaczeniu poziomu NOAEL. Do celów oceny powstałych przedurodzeniowych i pourodzeniowych skutków dla narządów limfoidalnych oprócz oceny histopatologicznej grasicy, śledziony i nadnerczy, która została już przeprowadzona u wszystkich zwierząt z kohorty 1A, należy także przeprowadzić ocenę histopatologiczną pobranych węzłów chłonnych i szpiku kostnego od 10 samców i 10 samic z kohorty 1A.

71. Tkanki układu rozrodczego i hormonalnego od wszystkich zwierząt z kohorty 1B przetworzone na bloczek, jak opisano w pkt 66, należy zbadać do celów histopatologii w przypadku, gdy podejrzewa się występowanie substancji zaburzających funkcjonowanie układu rozrodczego lub hormonalnego. Zwierzęta z kohorty 1B także powinny zostać poddane badaniu histologicznemu, jeżeli wyniki tego badania przeprowadzonego na zwierzętach z kohorty 1A są niejednoznaczne.

72. Jajniki dorosłych samic powinny zawierać pęcherzyki jajnikowe pierwotne i wzrastające oraz ciałka żółte; w związku z tym badanie histopatologiczne powinno mieć na celu sporządzenie oceny ilościowej pęcherzyków jajnikowych pierwotnych i małych pęcherzyków jajnikowych wzrastających oraz ciałek żółtych u samic z pokolenia F_1; liczba zwierząt, wybór wycinka jajnika oraz wielkość próbki wycinka powinny być statystycznie odpowiednie do zastosowanej procedury oceny. Oznaczenie liczby pęcherzyków można najpierw przeprowadzić na zwierzętach z grupy kontrolnej i grupy otrzymującej wysoką dawkę, a w przypadku wykrycia niepożądanych skutków w tej drugiej grupie należy zbadać zwierzęta z grupy otrzymującej niższe dawki. Badanie powinno obejmować oznaczenie liczby pęcherzyków jajnikowych pierwotnych, które można łączyć z małymi pęcherzykami wzrastającymi, w celu porównania jajników zwierząt z grupy badanej i zwierząt z grupy kontrolnej (zob. dokument zawierający wytyczne OECD nr 151 (40)). Ocenę ciałek żółtych należy przeprowadzać równolegle z badaniem cykliczności estrogenowej, tak aby w ocenie można było uwzględnić fazę cyklu. Jajowód, macicę i pochwę bada się pod kątem odpowiedniego rozwoju dla danego narządu.

73. Na samcach z pokolenia F_1 przeprowadza się szczegółowe badania histopatologiczne jąder w celu zidentyfikowania wpływu podawania substancji na różnicowanie się i rozwój jąder oraz na spermatogenezę (38). W miarę możliwości należy zbadać wycinki sieci jądra. Głowę, trzon i ogon najądrzy oraz nasieniowody bada się pod kątem odpowiedniego rozwoju dla danego narządu oraz pod kątem parametrów wymaganych w odniesieniu do samców z pokolenia P.

Zwierzęta z kohorty 2

74. Neurohistopatologię przeprowadza się według płci u wszystkich zwierząt z kohorty 2A należących do grupy otrzymującej wysoką dawkę oraz do grupy kontrolnej po zakończeniu badania neurobehawioralnego (po dniu 75 po urodzeniu, ale nie później niż w dniu 90 po urodzeniu). Histopatologię mózgu wykonuje się według płci u wszystkich zwierząt z kohorty 2B należących do grupy otrzymującej wysoką dawkę oraz do grupy kontrolnej w dniu 21 lub 22 po urodzeniu. Należy również zbadać narządy lub tkanki, które wykazują zmiany związane z podawaniem, u zwierząt z grup przyjmujących niższą dawkę, aby pomóc w wyznaczeniu poziomu NOAEL. W przypadku zwierząt z kohorty 2A i 2B przeprowadza się badanie licznych wycinków z mózgu, aby umożliwić zbadanie opuszków węchowych, kory mózgu, hipokampu, jądra podstawnego, wzgórza, podwzgórza, śródmózgowia (pokrywy śródmózgowia, nakrywki śródmózgowia i konarów mózgu), pnia mózgu i móżdżka. Tylko u zwierząt z kohorty 2A bada się oczy (siatkówkę i nerw wzrokowy) oraz próbki nerwu obwodowego, mięśni i rdzenia kręgowego. Wszystkie procedury neurohistologiczne powinny być spójne z metodą badawczą B.53 (35).

75. Oceny morfometryczne (ilościowe) należy przeprowadzać na reprezentatywnych obszarach mózgu (wycinki homologiczne starannie dobrane na podstawie wiarygodnych mikroskopowych punktów orientacyjnych) i mogą one obejmować pomiary liniowe lub powierzchniowe określonych obszarów mózgu. Należy pobrać co najmniej trzy kolejne wycinki z każdego punktu orientacyjnego (poziomu) w celu dobrania najbardziej homologicznego i reprezentatywnego dla określonego obszaru mózgu wycinka na potrzeby oceny. Neuropatolog powinien stwierdzić, czy wycinki przygotowane do pomiaru są homologiczne z innymi w zbiorze stanowiącym próbkę i w związku z tym odpowiednie do włączenia, ponieważ w szczególności pomiary liniowe mogą się zmieniać na stosunkowo niewielkim dystansie (28). Nie należy używać wycinków niehomologicznych. Chociaż celem jest

pobranie próbki od wszystkich zwierząt zarezerwowanych do tego celu (10/płeć/dawkę), mniejsza liczebność również może być odpowiednia. Próbki pobrane od mniej niż 6 zwierząt/płeć/dawkę z reguły nie będą jednak uznawane za wystarczające do celów opisywanej metody badawczej. Można zastosować stereologię w celu zidentyfikowania wpływu podawanej substancji na takie parametry jak objętość lub liczba komórek w odniesieniu do określonych obszarów neuroanatomicznych. Na wszystkich etapach preparowania próbek tkanek, począwszy od utrwalania tkanek przez sekcję próbek tkanek, przetwarzanie tkanki i barwienie preparatów, należy stosować zrównoważony schemat, tak aby każda seria zwierała reprezentatywne próbki z każdej grupy dawkowania. Jeżeli ma zostać przeprowadzona analiza morfometryczna lub stereologiczna, tkankę mózgową należy zanurzyć w odpowiednim roztworze w odniesieniu do wszystkich poziomów dawkowania w tym samym czasie w celu uniknięcia zmniejszania się artefaktów, co może być związane z przedłużonym przetrzymywaniem w utrwalaczu.

SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Dane

76. Dane dostarcza się oddzielnie i w podstaci podsumowania w formie zestawień tabelarycznych. W stosownych przypadkach w odniesieniu do każdej grupy badanej i każdego pokolenia należy przedstawić następujące dane: liczbę zwierząt na początku badania, liczbę zwierząt, które padły podczas badania lub które uśmiercono z przyczyn humanitarnych, czas śmierci lub uśmiercenia z przyczyn humanitarnych, liczbę płodnych zwierząt, liczbę ciężarnych samic, liczbę samic, które urodziły miot, oraz liczbę zwierząt, które wykazują oznaki toksyczności. Należy również dostarczyć opis toksyczności, w tym dzień wystąpienia, okres trwania i dotkliwość.

77. Wyniki numeryczne powinny zostać oszacowane z zastosowaniem właściwej i zatwierdzonej metody statystycznej. Metody statystyczne powinny zostać wybrane jako część projektu badania i powinny odpowiednio uwzględniać dane nienormalne (np. dane o liczbie), dane cenzurowane (np. ograniczony czas obserwacji), zależność (np. wpływ na miot i powtarzane pomiary) oraz nierówne wariancje. Uogólnione mieszane modele liniowe i modele oparte na zależności dawka-odpowiedź obejmują szeroki wybór narzędzi analitycznych, które mogą być odpowiednie dla danych uzyskanych w ramach omawianej metody badawczej. Sprawozdanie powinno zawierać wystarczające informacje na temat metody analizy i zastosowanego programu komputerowego, tak aby niezależny recenzent/statystyk mógł dokonać oceny/powtórnej oceny analizy.

Ocena wyników

78. Wyniki należy ocenić w odniesieniu do obserwowanych skutków, w tym wyników sekcji i badań mikroskopowych. Ocena obejmuje zależność lub brak zależności między dawką a obecnością, częstością występowania i dotkliwością nieprawidłowości, w tym poważnych zmian patologicznych. Należy również ocenić narządy docelowe, płodność, nieprawidłowości kliniczne, zmienione funkcje rozrodcze i wyniki w odniesieniu do miotów, zmiany masy ciała, śmiertelność i wszelkie inne skutki toksyczne i rozwojowe. Szczególną uwagę należy zwrócić na zmiany zależne od płci. Przy ocenie wyników badań należy uwzględnić właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej oraz, jeżeli są dostępne, dane toksykokinetyczne, w tym przenikanie przez łożysko i wydzielanie do mleka.

Sprawozdanie z badania

79. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje uzyskane w ramach niniejszego badania prowadzonego na zwierzętach z pokoleń P, F_1 oraz F_2 (w stosownych przypadkach):

Badana substancja chemiczna:

— wszystkie dostępne istotne informacje na temat substancji chemicznej, właściwości toksykokinetycznych i toksykodynamicznych badanej substancji chemicznej,

— dane identyfikacyjne,

— czystość.

Nośnik (w stosownych przypadkach):

— uzasadnienie wyboru nośnika, jeżeli jest inny niż woda.

Badane zwierzęta:

— wykorzystany gatunek/szczep,

— liczba zwierząt, ich wiek i ich płeć,

— źródło pochodzenia, warunki trzymania, pasza, materiały do budowy gniazda itp.,

— masa ciała każdego zwierzęcia na początku badania,

— dane dotyczące wymazu z pochwy w odniesieniu do samic z pokolenia P przed rozpoczęciem podawania (jeżeli dane zgromadzono w tym czasie),

— dane dotyczące kojarzenia u pokolenia P, wskazujące na samca i samicę, których wybrano do krycia, oraz czy doszło do krycia,

— dane dotyczące miotu pochodzenia w odniesieniu do dorosłych zwierząt z pokolenia F_1.

Warunki badania:

— uzasadnienie wyboru poziomu dawki,

— szczegóły dotyczące przygotowania formy użytkowej badanej substancji chemicznej/przygotowania paszy, uzyskanych stężeń,

— trwałość i jednorodność preparatu w nośniku lub substancji nośnikowej (np. paszy, wody pitnej), w krwi lub mleku w warunkach użytkowania i przechowywania między poszczególnymi dawkowaniami,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— w stosownych przypadkach przeliczenie stężeń (ppm) badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie pitnej na uzyskaną dawkę (mg/kg masy ciała/dobę),

— szczegóły dotyczące jakości pokarmu i wody (w tym składników paszy, jeżeli dostępne),

— szczegółowy opis procedur randomizacji stosowanych do doboru młodych do eliminacji i przydzielania młodych do grup badanych,

— warunki środowiskowe,

— wykaz personelu badawczego, w tym odbyte szkolenia zawodowe.

Wyniki (podsumowanie wszystkich danych i dane indywidualne według płci i dawki):

— spożycie pokarmu, spożycie wody, jeżeli odnośne dane są dostępne, wydajność pokarmu (przyrost masy ciała na gram spożywanego pokarmu, z wyjątkiem okresów wspólnego przebywania w klatce i laktacji) oraz spożycie badanej substancji chemicznej (w przypadku podawania z paszą/woda pitną) w odniesieniu do zwierząt z pokoleń P i F_1,

— dane dotyczące wchłaniania (jeżeli są dostępne),

— dane dotyczące masy ciała zwierząt z pokolenia P,

— dane dotyczące masy ciała wybranych zwierząt z pokolenia F_1 w okresie po odsadzeniu,

— czas śmierci, jeżeli zwierzę padło w trakcie badania, lub informacja, że zwierzęta przeżyły do uśmiercenia,

— charakter, dotkliwość i czas trwania obserwacji klinicznych (odwracalne czy nie),

— dane pochodzące z hematologii, badania moczu i chemii klinicznej, w tym dotyczące TSH i T4,

— analiza fenotypowa limfocytów śledziony (limfocytów T, limfocytów B i komórek NK),

— komórkowość szpiku kostnego,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność,

— liczba samic z pokoleń P i F_1, u których występuje normalny lub nienormalny cykl estrogenowy i czas trwania cyklu,

— czas do krycia (odstęp przed kopulacją, liczba dni między kojarzeniem a kryciem),

— skutki toksyczne lub inne dla rozrodczości, w tym liczba i odsetek zwierząt, które przeszły przez krycie, ciążę, poród i laktację, liczba i odsetek samców, które zapłodniły samice, oraz samic z objawami dystocji/długotrwałego lub trudnego porodu,

— czas trwania ciąży oraz, jeżeli odnośne dane są dostępne, porodu,

— liczba zagnieżdżeń, liczebność miotu i odsetek samców wśród młodych,

— liczba i odsetek strat pozagnieżdżeniowych, żywych urodzeń i martwych urodzeń,

— dane dotyczące masy miotu i masy młodych (samców, samic i łącznie), liczba słabowitych młodych, jeżeli ją określono,

— liczba młodych z wyraźnie widocznymi nieprawidłowościami,

— skutki toksyczne lub inne dla potomstwa, rozwoju pourodzeniowego, żywotności itp.,

— dane dotyczące fizycznych punktów orientacyjnych u młodych i inne dane dotyczące rozwoju pourodzeniowego,

— dane dotyczące dojrzewania płciowego zwierząt z pokolenia F_1,

— w stosownych przypadkach dane dotyczące obserwacji funkcjonalnych młodych i dorosłych,

— dane dotyczące masy ciała w momencie uśmiercania oraz bezwzględnej i względnej masy narządu w odniesieniu do zwierząt z pokolenia P i dorosłych z pokolenia F_1,

— wyniki sekcji,

— szczegółowy opis wszystkich wyników histopatologicznych,

— całkowita liczba plemników w ogonie najądrza, odsetek poruszających się postępowo plemników, odsetek morfologicznie normalnych plemników oraz odsetek plemników z każdą określoną nieprawidłowością w odniesieniu do samców z pokoleń P i F_1,

— w stosownych przypadkach liczba i stadia dojrzewania pęcherzyków jajnikowych znajdujących się w jajnikach samic z pokoleń P i F_1,

— oznaczenie liczby ciałek żółtych w jajnikach samic z pokolenia F_1,

— w stosownych przypadkach statystyczne opracowanie wyników.

Parametry kohorty 2:

— szczegółowy opis procedur stosowanych do standaryzacji obserwacji i procedur oraz definicji operacyjnych do celów punktowego oceniania obserwacji,

— wykaz wszystkich zastosowanych procedur badawczych i uzasadnienie ich zastosowania,

— szczegóły dotyczące zastosowanych procedur behawioralnych/funkcjonalnych, neuropatologicznych i morfometrycznych, w tym informacje i szczegóły dotyczące urządzeń automatycznych,

— procedury kalibracji i zapewniania równoważności urządzeń oraz bilansowanie grup badanych w procedurach badawczych,

— krótkie uzasadnienie wyjaśniające wszelkie decyzje wiążące się z opinią eksperta,

— szczegółowy opis wszystkich wyników behawioralnych/funkcjonalnych, neuropatologicznych i morfometrycznych według płci i grupy dawkowania, w tym wzrosty i spadki w porównaniu do grupy kontrolnej,

— masa mózgu,

— wszelkie diagnozy postawione na podstawie objawów neurologicznych i zmian patologicznych, w tym pojawiające się w sposób naturalny choroby lub schorzenia,

— obrazy przykładowych wyników badań,

— obrazy z urządzeń o małej mocy do oceny homologii wycinków zastosowanych do celów morfometrii,

— statystyczne opracowanie wyników, w tym modele statystyczne zastosowane w celu analizy danych i wyników, niezależnie od tego, czy były one istotne,

— związek wszelkich innych skutków toksycznych z wnioskiem dotyczącym potencjału neurotoksycznego badanej substancji chemicznej według płci i grupy dawkowania,

— wpływ wszelkich informacji toksykokinetycznych na wnioski,

— dane potwierdzające wiarygodność i czułość metody badawczej (tj. dane dotyczące dodatnich i historycznych kontroli),

— związki, jeżeli występują, między skutkami neuropatologicznymi a czynnościowymi,

— NOAEL lub dawka wyznaczająca w odniesieniu do matek i potomstwa według płci i grupy dawkowania,

— dyskusja na temat ogólnej interpretacji danych na podstawie wyników, w tym wniosek dotyczący tego, czy substancja chemiczna spowodowała neurotoksyczność rozwojową i NOAEL.

Parametry kohorty 3:

— miana przeciwciał IgM w surowicy (sensytyzacja na SRBC lub KLH) lub jednostki komórek tworzących łysinki w śledzionie (sensytyzacja na SRBC),

— działanie metody reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T powinno zostać potwierdzone w ramach procesu optymalizacji przez laboratorium, które wykonuje test po raz pierwszy, a następnie powinno być potwierdzane okresowo przez wszystkie laboratoria (np. corocznie),

— omówienie ogólnej interpretacji danych na podstawie wyników, w tym wniosek dotyczący tego, czy substancja chemiczna spowodowała immunotoksyczność rozwojową i NOAEL.

Omówienie wyników

Wnioski, w tym wartości NOAEL w odniesieniu do skutków dla rodziców i potomstwa

Należy również przekazać wszystkie informacje, których nie uzyskano w trakcie badania, a które są przydatne do celów interpretacji wyników (np. podobieństwa skutków do tych wywoływanych przez jakiekolwiek znane środki neurotoksyczne).

Interpretacja wyników

80. Rozszerzone badanie toksyczności reprodukcyjnej jednego pokolenia dostarczy informacji na temat wpływu powtarzanego narażenia na substancję chemiczną podczas wszystkich faz cyklu rozrodczego, w zależności od potrzeb. W szczególności badanie dostarczy informacji na temat układu rozrodczego oraz rozwoju, wzrostu, przeżycia i funkcjonalnych punktów końcowych w odniesieniu do potomstwa w wieku do 90 dnia po urodzeniu.

81. W interpretacji wyników badania należy uwzględniać wszystkie dostępne informacje dotyczące substancji chemicznej, w tym właściwości fizykochemiczne, toksykokinetyczne i toksykodynamiczne, dostępne odpowiednie informacje na temat analogów strukturalnych oraz wyniki przeprowadzonych wcześniej badań toksyczności z użyciem badanej substancji chemicznej (np. ostra toksyczność, toksyczność po powtarzanym podawaniu, badania mechanistyczne i badania oceniające, czy występują istotne różnice jakościowe i ilościowe między gatunkami pod względem właściwości metabolicznych *in vivo*/*in vitro*). Pełne rozpoznanie histopatologiczne i wyniki pomiarów masy narządów należy oceniać w kontekście obserwacji poczynionych podczas innych badań powtarzanego dawkowania, jeżeli jest to wykonalne. Można uznać, że obniżony wzrost potomstwa ma związek z wpływem badanej substancji chemicznej na skład mleka (29).

Kohorta 2 (neurotoksyczność rozwojowa)

82. Wyniki neurobehawioralne i neuropatologiczne należy interpretować w kontekście wszystkich ustaleń, stosując podejście wagi dowodów i wiedzę specjalistyczną. Należy omówić wzory wyników badań behawioralnych lub morfologicznych, jeżeli występują, oraz dowody zależności dawka-odpowiedź. W tej charakterystyce należy zawrzeć ocenę neurotoksyczności rozwojowej, w tym badania epidemiologiczne u ludzi lub studia przypadków, i badania na zwierzętach doświadczalnych (np. dane toksykokinetyczne, informacje dotyczące związku między strukturą a działaniem, dane z innych badań toksyczności). Ocena danych powinna obejmować omówienie istotności biologicznej i statystycznej. Ocena powinna obejmować związek, jeżeli taki występuje, między obserwowanymi zmianami neuropatologicznymi i behawioralnymi. W odniesieniu do wytycznych dotyczących interpretowania wyników neurotoksyczności rozwojowej należy zapoznać się z metodą badawczą B.53 (35) oraz publikacją Tyl i in., 2008 (31).

Kohorta 3 (immunotoksyczność rozwojowa)

83. Supresję lub wzmocnienie funkcji układu odpornościowego stwierdzone w reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T należy oceniać w kontekście wszystkich poczynionych obserwacji. Znaczenie wyników reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T mogą potwierdzać inne oddziaływania na wskaźniki związane z odpornością (np. komórkowość szpiku kostnego, masa i histopatologia tkanek limfoidalnych, rozkład podzbioru limfocytów). Skutki ustalone w ramach reakcji przeciwciał zależnej od limfocytów T mogą mieć mniejsze znaczenie w przypadku innych toksyczności obserwowanych przy niższym stężeniu narażenia.

84. Przy interpretowaniu wyników dotyczących rozrodczości i neurotoksyczności pomocny może być dokument zawierający wytyczne OECD nr 43 (26).

LITERATURA

(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., Walls, I. (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Waszyngton DC.

(4) 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.

(5) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999), »Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment«, *Toxicol. Sci.*, 49: 1–4.

(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*, część 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*, część B, 80 (2), 84–97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), »Cycles and Seasons«, [w:] C.R. Auston and R.V. Short (red.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, Nowy Jork.

(12) 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.

(13) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977), »Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat«, *Biological Reproduction*, 17, 298–303.

(14) Ladics, G.S. (2007), »Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing«, *Methods*, 41, 9–19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), »Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation«, *Toxicology*, 197, 23–35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), »A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat«, *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), »Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats«, *Journal of Reproduction and Fertility*,54, 103–107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), »The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat«. *Reproductive Toxicology*,5, 39–44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), »Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report«, *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), »Methods for Assessing Rat Sperm Motility«, *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), »Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration«, *Journal of Andrology*, 13, 409–421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), »Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations«, *Reproductive Toxicology,* 5, 449–458.

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), »Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer«, *Methods in Toxicology, Część A*, Academic, Orlando, Floryda. s. 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 Spermatoxicity 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, Paryż.

(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, Paryż.

(33) Rozdział B.43 niniejszego załącznika: »Badanie neurotoksyczności u gryzoni«.

(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, Paryż.

(35) Rozdział B.53 niniejszego załącznika: »Badanie neurotoksyczności rozwojowej«.

(36) Rozdział B.54 niniejszego załącznika: »Test biologiczny wzrostu macicy u gryzoni: krótkoterminowe badanie przesiewowe właściwości estrogennych«.

(37) Rozdział B.55 niniejszego załącznika: »Test biologiczny Hershbergera na szczurach: krótkoterminowe badanie przesiewowe właściwości (anty)androgennych«.

(38) OECD (2009), *Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents,* Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paryż.

(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, Paryż.

(40) OECD (2013), *Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study,* Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paryż.

Dodatek 1

Pomiary i obserwacje uwzględnione w zestawie badań funkcjonalno-obserwacyjnych (kohorta 2A)

Klatka macierzysta i otwarta przestrzeń	Manipulacyjne	Fizjologiczne
Postawa	Łatwość usuwania	Temperatura
Mimowolne ruchy kloniczne i toniczne	Łatwość obchodzenia się	Masa ciała
Zamknięcie powiek	Tonus	Reakcja źrenicy
Piloerksja	Reakcja na podejście	Rozmiar źrenicy
Ślinienie	Reakcja na dotyk	
Łzawienie	Reakcja słuchowa	
Wydawanie odgłosów	Reakcja na szczypanie ogona	
Stawanie na tylnych kończynach	Reakcja przyjmowania prawidłowej postawy	
Nieprawidłowości w chodzie	Odległość między kończynami tylnymi przy lądowaniu	
Pobudzenie	Siła uchwytu kończyn przednich	
Stereotypia	Siła uchwytu kończyn tylnych	
Dziwne zachowania		
Plamy		
Nieprawidłowości w oddychaniu		

Dodatek 2

DEFINICJE:

Substancja chemiczna: oznacza substancję lub mieszaninę.

Badana substancja chemiczna: oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

B.57. **TEST STEROIDOGENEZY H295R**

WPROWADZENIE

1. Opisywana metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 456 (2011 r.). W 1998 r. OECD podjęła działania o wysokim priorytecie, mające na celu zmianę istniejących wytycznych i opracowanie nowych wytycznych na potrzeby badań przesiewowych i badania potencjalnych substancji zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego. Ramy koncepcyjne OECD z 2002 r. w zakresie badań i oceny substancji chemicznych zaburzających funkcjonowanie układu hormonalnego (Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals) obejmują pięć poziomów, z których każdy odpowiada innemu poziomowi złożoności biologicznej (1). W opisanym w niniejszej metodzie badawczej teście steroidogenezy H295R *in vitro* (H295R) wykorzystuje się linię ludzkich komórek raka nadnercza (komórki NCI-H295R) i stanowi on »test *in vitro* pozwalający na uzyskanie danych mechanistycznych« poziomu 2, do celów badań przesiewowych i ustalania substancji priorytetowych. Opracowanie i standaryzacja powyższego testu jako badania przesiewowego chemicznego wpływu na steroidogenezę, w szczególności na produkcję 17β-estradiolu (E2) i testosteronu (T), odbywały się w wielu etapach. Test H295R był optymalizowany i poddawany walidacji (2)(3)(4)(5).

2. Test steroidogenezy H295R ma na celu wykrywanie substancji chemicznych, które mają wpływ na produkcję E2 i T. Test H295R ma identyfikować ksenobiotyki, których działanie ukierunkowane jest na składniki endogenne składające się na międzykomórkowy szlak biochemiczny rozpoczynający się sekwencją reakcji od cholesterolu po produkcję E2 lub T. Test H295R nie ma na celu identyfikacji substancji chemicznych, które wpływają na steroidogenezę, z uwagi na jego oddziaływanie na oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG). Celem opisywanego testu jest uzyskanie odpowiedzi TAK/NIE w odniesieniu do zdolności danej substancji chemicznej do wywoływania lub hamowania produkcji T i E2; jednak w niektórych przypadkach można uzyskać wyniki ilościowe (zob. pkt 53 i 54). Wyniki testu wyraża się jako względne zmiany w produkcji hormonów w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnika (KR). Celem tego testu nie jest dostarczenie określonych informacji mechanistycznych dotyczących interakcji badanej substancji chemicznej z układem hormonalnym. Aby zidentyfikować wpływ na określone enzymy i hormony pośrednie, takie jak progesteron, przeprowadzono badania z wykorzystaniem danej linii komórkowej (2).

3. Definicje i skróty stosowane w opisywanej metodzie badawczej są opisane w dodatku. Szczegółowy protokół zawierający wskazówki dotyczące sposobu przygotowywania roztworów, hodowania komórek i przeprowadzania różnych aspektów testu przedstawiono w dodatkach I–III do dokumentu OECD »Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production« (Międzylaboratoryjna walidacja testu steroidogenezy H295R mająca na celu identyfikację modulatorów wytwarzania testosteronu i estradiolu) (4).

ZAŁOŻENIA WSTĘPNE I OGRANICZENIA

4. W biosyntezie sześciu sterydowych hormonów płciowych udział bierze pięć różnych enzymów katalizujących sześć różnych reakcji. Enzymatyczna konwersja cholesterolu do pregnenolonu za pomocą enzymu rozszczepiającego łańcuch boczny cholesterolu (CYP11 A) z rodziny enzymów cytochromu P450 (CYP) stanowi początkowy etap serii reakcji biochemicznych, które prowadzą do syntezy sterydowych produktów końcowych. W zależności od kolejności następnych dwóch reakcji następuje podział szlaku steroidogenezy na dwa szlaki, szlak Δ^5-hydroksysteroidowy i szlak Δ^4-ketosteroidowy, które łączą się w produkcji androstenedionu (rys. 1).

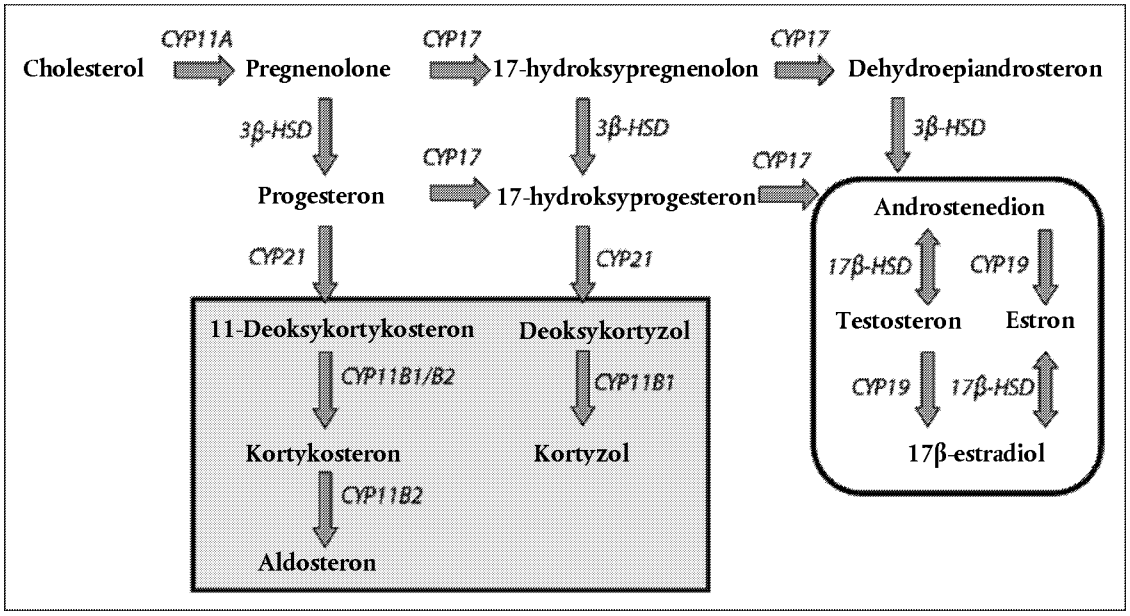
5. Konwersja androstenedionu do testosteronu (T) zachodzi za pomocą dehydrogenazy 17β-hydroksysteroidowej (17β-HSD). Testosteron jest zarówno hormonem pośrednim, jak i produktem końcowym. U samców T można przekształcić w dihydrotestosteron (DHT) w wyniku działania 5-α-red.uktazy, która znajduje się w błonach komórkowych, otoczce jądrowej i siateczce śródplazmatycznej tkanek, na które ukierunkowane jest działanie androgenów, takich jak prostata i pęcherzyki nasienne. DHT jest znacznie silniejszy jako androgen niż T i jest również uważany za hormon końcowy. W teście H295R nie mierzy się poziomu dihydrotestosteronu (zob. pkt 10).

6. Enzymem w przebiegu steroidogenezy, który umożliwia konwersję androgenowych substancji chemicznych w estrogenowe substancje chemiczne jest aromataza (CYP19). Aromataza przekształca testosteron (T) w 17β-estradiol (E2), a androstenedion w estron. E2 i T uważa się za końcowe hormony szlaku steroidogenezy.

7. Specyfika działania liazów CYP17 różni się w odniesieniu do substratów pośrednich między gatunkami. U ludzi enzym ten faworyzuje substraty szlaku Δ^5-hydroksysteroidowego (pregnenolon), natomiast u szczurów faworyzowane są substraty w szlaku Δ^4-ketosteroidowym (progesteron) (19). Takie różnice w działaniu liazów CYP17 mogą wyjaśniać niektóre różnice w reakcji na substancje chemiczne między gatunkami, które skutkują zmianą steroidogenezy *in vivo* (6). Wykazano, że komórki H295 najwierniej odzwierciedlają ekspresję enzymów kory nadnerczy oraz schemat produkcji sterydów u ludzi dorosłych (20), ale znane są z ekspresji enzymów zarówno w szlaku Δ^5-hydroksysteroidowym, jak i w szlaku Δ^4-ketosteroidowym syntezy androgenu (7)(11)(13)(15).

Rysunek 1

Przebieg steroidogenezy w komórkach H295R



Uwaga:
Enzymy oznaczono kursywą, hormony oznaczono wytłuszczeniem, zaś strzałki wskazują kierunek syntezy. Szare tło wskazuje na szlaki/produkty kortykosterydowe. W okrągłej ramce umieszczono szlaki/produkty sterydowych hormonów płciowych. CYP = cytochrom P450; HSD = dehydrogenaza hydroksysteroidowa; DHEA = dehydroepiandrosteron.

8. Linia ludzkich komórek raka nadnercza H295R stanowi użyteczny model *in vitro* do celów badania wpływu na syntezę hormonów sterydowych (2)(7)(8)(9)(10). W linii komórek H295R zachodzi ekspresja genów kodujących dla wszystkich przedstawionych powyżej enzymów kluczowych dla steroidogenezy (11)(15) (rys. 1). Jest to unikalna właściwość, ponieważ ekspresja tych genów *in vivo* jest uzależniona od tkanek i stadium rozwojowego i zazwyczaj żadna pojedyncza tkanka ani pojedyncze stadium rozwojowe nie pozwala na ekspresję wszystkich genów biorących udział w steroidogenezie (2). Komórki H295R wykazują właściwości fizjologiczne strefowo niezróżnicowanych komórek nadnercza ludzkiego płodu (11). Komórki te stanowią wyjątkowy system *in vitro*, z uwagi na fakt, że posiadają one zdolność produkowania wszystkich hormonów sterydowych występujących w korze nadnerczy i gonadach u dorosłych ludzi, pozwalając na badanie wpływu na syntezę kortykosterydów i produkcję sterydowych hormonów płciowych, takich jak androgeny i estrogeny, mimo że test ten uzyskał walidację wyłącznie w odniesieniu do wykrywania T i E2. Zmiany zarejestrowane przez system testowy w postaci zmian w produkcji T i E2 mogą być wynikiem szeregu różnych interakcji badanych substancji chemicznych o funkcjach związanych ze steroidogenezą, które wyrażają komórki H295R. Mogą one obejmować modulację ekspresji, syntezy lub działania enzymów biorących udział w produkcji, transformacji lub eliminacji hormonów sterydowych (12)(13)(14). Zahamowanie produkcji hormonów może być wynikiem bezpośredniego konkurencyjnego wiązania z enzymem w szlaku, wpływu na współczynniki, takie jak NADPH (fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego) i cAMP (cykliczny adenozynomonofosforan) lub zwiększenia metabolizmu sterydów lub supresji ekspresji genów niektórych enzymów w szlaku steroidogenezy. Podczas gdy zahamowanie może być funkcją zarówno bezpośrednich, jak i pośrednich procesów składających się na produkcję hormonów, indukcja ma zazwyczaj charakter pośredni na przykład poprzez oddziaływanie na współczynniki takie jak NADPH i cAMP (podobnie jak w przypadku forskoliny), ograniczanie metabolizmu sterydów (13) i zwiększanie ekspresji genów steroidogenezy.

9. Test H295R ma liczne zalety:

— pozwala na wykrywanie zarówno zwiększenia, jak i zmniejszenia produkcji T i E2,

— umożliwia bezpośrednią ocenę potencjalnego wpływu substancji chemicznej na żywotność/cytotoksyczność komórek. Jest to istotna cecha, ponieważ pozwala na odróżnienie skutków będących wynikiem cytotoksyczności od skutków, które wynikają z bezpośredniej interakcji substancji chemicznych ze szlakami steroidogenezy, co nie jest możliwe w przypadku systemów eksplantów tkanek, które składają się z licznych rodzajów komórek charakteryzujących się różnymi czułościami i funkcjami,

— nie wymaga wykorzystywania zwierząt,

— linia komórek H295R jest dostępna na rynku.

10. Główne ograniczenia tego testu są następujące:

— zdolność metaboliczna testu nie jest znana, ale najprawdopodobniej jest dosyć ograniczona; w związku z tym substancje chemiczne, które wymagają aktywacji metabolicznej, zostaną prawdopodobnie pominięte w tym teście;,

— ponieważ komórki H295R uzyskuje się z tkanki nadnercza, zawierają one enzymy zdolne do produkowania gluko- i mineralokortykoidów oraz hormonów płciowych, w związku z czym oddziaływanie na produkcję gluko- i mineralokortykoidów może mieć wpływ na obserwowane w ramach tego testu poziomy T i E2,

— w teście tym nie dokonuje się pomiaru poziomu DHT i w związku z tym nie oczekuje się, że zostaną wykryte substancje chemiczne hamujące 5-α-reduktazę; w takim przypadku można zastosować test Hershbergera (16),

— w teście H295R nie zostaną wykryte substancje chemiczne zakłócające steroidogenezę poprzez oddziaływanie na oś podwzgórze–przysadka–gonady (HPG), ponieważ można to zbadać wyłącznie na zwierzętach nienaruszonych.

ZASADA BADANIA

11. Opisywany test ma na celu wykrywanie substancji chemicznych, które mają wpływ na produkcję T i E2. T jest również produktem pośrednim na szlaku prowadzącym do produkcji E2. W omawianym teście można wykryć substancje chemiczne, które zazwyczaj hamują lub wywołują działanie enzymów szlaku steroidogenezy.

12. Omawiany test przeprowadza się zazwyczaj w normalnych warunkach kultury komórkowej na płytkach 24-dołkowych. Ewentualnie dopuszcza się stosowanie innych rozmiarów płytek do przeprowadzania testu; warunki posiewu i warunki doświadczalne należy odpowiednio dostosowywać, aby zachować zgodność z kryteriami wykonania testu.

13. Po zakończeniu 24-godzinnego okresu aklimatyzacji w płytkach wielodołkowych komórki poddaje 48-godzinnemu okresowi narażenia na siedem stężeń badanej substancji chemicznej co najmniej trzykrotnie. Rozpuszczalnik oraz znany inhibitor produkcji hormonów i czynnik wywołujący produkcję hormonów w stałym stężeniu stosuje się jako kontrole ujemną i dodatnią. Po zakończeniu okresu narażenia z każdego dołka usuwa się podłoże. Natychmiast po usunięciu podłoża bada się żywotność komórek w każdym dołku. Stężenia hormonów w podłożu można mierzyć, stosując szereg różnych metod, w tym za pomocą dostępnych na rynku zestawów do pomiaru hormonów lub technik instrumentalnych, takich jak chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią masową (LC-MS). Dane wyraża się jako krotność zmiany w stosunku do kontroli rozpuszczalnika i najniższego stężenia, przy którym obserwuje się zmiany (LOEC). Jeżeli wynik testu jest ujemny, najwyższe zbadane stężenie rejestruje się jako najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOEC). Wnioski dotyczące zdolności substancji chemicznej do oddziaływania na steroidogenezę należy formułować na podstawie co najmniej dwóch niezależnych prób badawczych. Pierwsza próba badawcza może pełnić rolę próby służącej ustaleniu zakresu, po którym w razie potrzeby dostosowuje się stężenia dla prób 2 i 3, jeżeli wystąpią problemy związane z rozpuszczalnością lub cytotoksycznością lub jeżeli wydaje się, że aktywność danej substancji chemicznej znajduje się na poziomie granicznej wartości zakresu badanych stężeń.

PROCEDURA HODOWLI

Linia komórkowa

14. Komórki NCI-H295R są dostępne komercyjnie z amerykańskiego zbioru typów kultur (ATCC) po podpisaniu porozumienia o transferze materiału (MTA) ([1]).

Wprowadzenie

15. W związku ze zmianami zdolności komórek do produkcji E2 wraz z wiekiem i wzrostem liczby pasaży (2), komórki należy hodować zgodnie z określonym protokołem, zanim zostaną wykorzystane, i należy odnotować liczbę pasaży od momentu rozmrożenia komórek oraz numer pasażu, przy którym komórki zostały zamrożone i umieszone w zbiorniku z ciekłym azotem. Pierwsza wartość oznacza faktyczną liczbę pasaży komórek, podczas gdy druga wartość oznacza numer pasażu, przy którym komórki zostały zamrożone i umieszczone w zbiorniku. Przykładowo komórki, które zostały zamrożone po piątym pasażu i rozmrożone, a następnie trzykrotnie podzielone (4 pasaże, licząc świeżo rozmrożone komórki jako pasaż 1), po ponownym umieszczeniu w hodowli zostałyby oznaczone jako pasaż 4.5. Przykładowy schemat numerowania przedstawiono w dodatku I do sprawozdania z walidacji (4).

16. Podłoże wyjściowe stosuje się jako podstawę podłoża wzbogaconego i podłoża do zamrażania. Podłoże wzbogacone jest niezbędnym składnikiem do hodowli komórek. Podłoże do zamrażania jest specjalnie opracowane, aby umożliwić zamrażanie komórek bez skutków ubocznych do celów ich długoterminowego przechowywania. Przed

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

zastosowaniem należy przeprowadzić analizę Nu-serum (lub porównywalnego serum o równoważnych właściwościach, w przypadku którego wykazano, że dostarcza danych spełniających wymogi w zakresie przeprowadzania testu i kontroli jakości), które jest składnikiem podłoża wzbogaconego, pod kątem wyjściowych stężeń T i E2. Sposób przygotowania tych roztworów opisano w dodatku II do sprawozdania z walidacji (4).

17. Po zainicjowaniu kultury komórkowej H295R z oryginalnej partii ATCC komórki należy hodować przez pięć pasaży (tj. komórki dzieli się czterokrotnie). Komórki pasażu piątego są następnie zamrażane w ciekłym azocie do celów przechowywania. Przed zamrożeniem komórek dokonuje się analizy próbki komórek poprzedniego pasażu czwartego na płytce kontroli jakości (zob. pkt 36 i 37), aby zweryfikować, czy podstawowa produkcja hormonów i reakcja na substancje chemiczne kontroli dodatniej spełniają wymogi w zakresie kontroli jakości testu zgodnie z tabelą 5.

18. Komórki H295R należy hodować, zamrozić i przechowywać w ciekłym azocie, aby mieć pewność, że komórki z odpowiedniego pasażu/w odpowiednim wieku są zawsze dostępne do hodowli i użytku. Maksymalna liczba pasaży po wybraniu nowej ([1]) lub zamrożonej ([2]) partii komórek do kultury komórkowej, która jest dopuszczalna w przypadku testu H295R, nie powinna przekraczać 10. Przykładowo w przypadku kultur komórek pochodzących z partii zamrożonych przy pasażu 5 dopuszczalne byłyby pasaże z przedziału 4.5–10.5. W przypadku komórek uzyskanych z tych zamrożonych partii należy przestrzegać procedury opisanej w pkt 19. Komórki te należy hodować przez co najmniej cztery (4) dodatkowe pasaże (pasaż 4.5), zanim zostaną wykorzystane do testów.

Uzyskiwanie komórek z zamrożonego zapasu

19. Procedurę uzyskiwania komórek z zamrożonego zapasu należy stosować w przypadku, gdy nową partię komórek wyjmuje się z ciekłego azotu do celów hodowli i testów. Szczegóły dotyczące tej procedury przedstawiono w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4). Komórki wyjmuje się z ciekłego azotu, natychmiast się je rozmraża, umieszcza w podłożu wzbogaconym w probówce wirówkowej, odwirowuje w temperaturze pokojowej, ponownie zawiesza w podłożu wzbogaconym, a następnie umieszcza się je w kolbie do kultur komórkowych. Następnego dnia należy zmienić podłoże. Komórki H295R hoduje się w inkubatorze w temperaturze 37 °C w warunkach, w których zawartość CO_2 w powietrzu wynosi 5 %, a podłoże zmienia się na nowe 2–3 razy w tygodniu. W momencie osiągnięcia przez komórki konfluencji na poziomie 85–90 %, należy je podzielić. Podział komórek jest konieczny, aby zapewnić zdrowie i wzrost komórek oraz aby utrzymać komórki do celów przeprowadzania testów biologicznych. Komórki płucze się trzykrotnie w roztworze chlorku sodu buforowanym fosforanami (PBS bez zawartości Ca^{2+} Mg^{2+}) i wydostaje się je z kolby do kultur komórkowych, dodając odpowiedni enzym powodujący oddzielenie, np. trypsynę, w PBS (bez zawartości Ca^{2+} Mg^{2+}). Natychmiast po oddzieleniu się komórek od kolby do kultur komórkowych należy zatrzymać działanie enzymu poprzez dodanie podłoża wzbogaconego w stosunku 3-krotności objętości zastosowanej do podania enzymu. Komórki umieszcza się w probówce wirówkowej, odwirowuje się je w temperaturze pokojowej, usuwa się supernatant i dokonuje się ponownego zawieszenia osadu komórek w podłożu wzbogaconym. Odpowiednią ilość roztworu z komórkami umieszcza się w nowej kolbie do kultur komórkowych. Ilość roztworu z komórkami należy dostosować tak, aby komórki osiągnęły stan konfluencji w ciągu 5–7 dni. Zalecany wskaźnik subhodowli wynosi 1:3–1:4. Płytkę należy ostrożnie oznakować. Komórki można teraz wykorzystać do celów testu, a ich nadmiar należy zamrozić w ciekłym azocie w sposób opisany w pkt 20.

Zamrażanie komórek H295R (przygotowywanie komórek do przechowywania w ciekłym azocie)

20. W celu przygotowania komórek H295R do zamrożenia należy stosować procedurę opisaną powyżej w odniesieniu do podziału komórek aż do etapu ponownego zawieszania osadu komórek na dnie probówki wirówkowej. Na tym etapie osad komórek ponownie zawiesza się w podłożu do zamrażania. Roztwór przenosi się do odpowiednio oznakowanej fiolki kriogenicznej i zamraża w temperaturze -80 °C na 24 godziny, a następnie fiolkę kriogeniczną umieszcza się w ciekłym azocie do celów przechowywania. Szczegóły dotyczące tej procedury przedstawiono w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4).

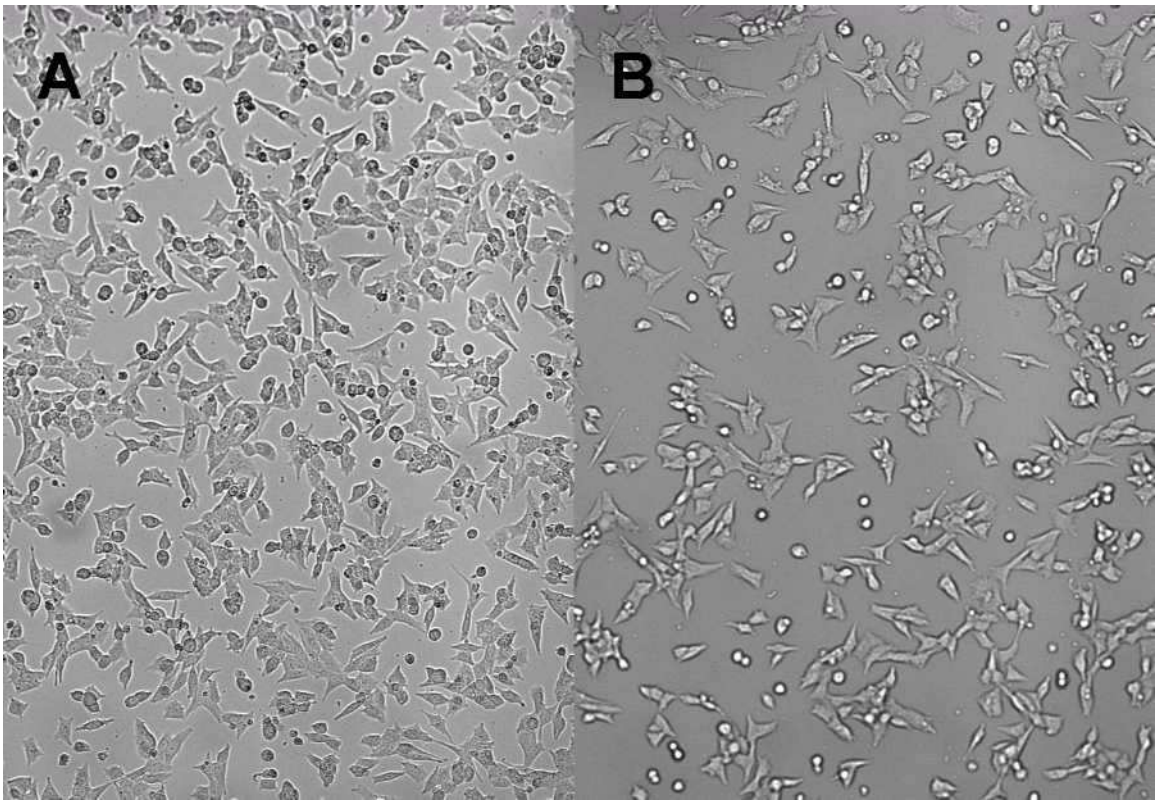
Posiew i wstępna inkubacja tkanek do celów badania

21. Potrzebna liczba płytek 24-dołkowych, przygotowanych zgodnie z opisem w pkt 19, będzie uzależniona od liczby badanych substancji chemicznych i konfluencji komórek w naczyniach z kulturami. Zgodnie z zasadą ogólną jedna kolba do kultur komórkowych (75 cm^2) zawierająca komórki w stanie konfluencji na poziomie 80–90 % zapewni wystarczającą liczbę komórek dla 1–1,5 płytki (24-dołkowej) o gęstości docelowej wynoszącej 200 000–300 000 komórek na ml podłoża, co skutkuje uzyskaniem w dołkach konfluencji na poziomie 50–60 % po upływie 24 godzin (rys. 2). Stanowi to zazwyczaj optymalny poziom gęstości komórek do produkcji hormonów w teście. W przypadku wyższych gęstości schematy produkcji T i E2 ulegają zmianie. Przed przeprowadzeniem testu po raz pierwszy zaleca się zbadanie różnych gęstości posiewu między 200 000 a 300 000 komórek na ml oraz wybranie gęstości skutkującej konfluencją na poziomie 50–60 % w dołku po upływie 24 godzin do celów dalszych doświadczeń.

([1]) »Nowa partia« odnosi się do świeżej partii komórek otrzymanych ze zbioru kultur typu amerykańskiego.
([2]) »Zamrożona partia« odnosi się do komórek, które zostały uprzednio wyhodowane, a następnie zamrożone w laboratorium, innych niż komórki ze zbioru kultur typu amerykańskiego.

Rysunek 2

Mikrofotografia komórek H295R o zagęszczeniu na poziomie 50 % na płytce 24-dołkowej zawierającej kulturę komórkową wykonana w 24 godzinie na krańcu (A) i w środkowej części (B) dołka



22. Podłoże usuwa się z kolby do kultur komórkowych za pomocą pipety, a komórki płucze się 3-krotnie za pomocą sterylnego PBS (niezawierającego $Ca^{2+}Mg^{2+}$). Dodaje się roztwór enzymu (w PBS) w celu oddzielenia komórek od kolby do kultur komórkowych. Po upływie odpowiedniego czasu na oddzielenie się komórek należy zatrzymać działanie enzymu poprzez dodanie podłoża wzbogaconego w stosunku 3-krotności objętości zastosowanej do podania enzymu. Komórki umieszcza się w probówce wirówkowej, odwirowuje się je w temperaturze pokojowej, usuwa się supernatant i dokonuje się ponownego zawieszenia osadu komórek w podłożu wzbogaconym. Gęstość komórek oblicza się za pomocą np. hemocytometru lub narzędzia do liczenia komórek. Roztwór z komórkami należy rozcieńczyć do uzyskania oczekiwanej gęstości posiewu i dokładnie wymieszać, aby zapewnić jednorodną gęstość komórek. Należy dokonać posiewu komórek, stosując 1 ml roztworu z komórkami na dołek oraz oznakować płytki i dołki. Posiane płytki inkubuje się przez 24 godziny w temperaturze 37 °C w warunkach, w których zawartość CO_2 w powietrzu wynosi poniżej 5 %, aby umożliwić komórkom osadzenie się w dołkach.

WYMOGI W ZAKRESIE KONTROLI JAKOŚCI

23. Niezwykle istotne jest dostarczenie dokładnych objętości roztworów i próbek do dołków podczas dawkowania, ponieważ objętości te decydują o stężeniach wykorzystywanych w obliczeniach wyników testu.

24. Przed zainicjowaniem kultury komórkowej i rozpoczęciem wszelkich dalszych badań każde laboratorium powinno wykazać czułość swojego systemu pomiaru hormonów (pkt 29–31).

25. Jeżeli planuje się zastosowanie testów pomiaru hormonów na podstawie przeciwciał, badane substancje chemiczne należy poddać analizie pod kątem ich potencjału do zakłócania systemu pomiaru wykorzystywanego do ilościowego określenia T i E2, jak opisano w pkt 32, przed rozpoczęciem testów.

26. Zaleca się stosowanie sulfotlenku dimetylu (DMSO) jako rozpuszczalnika do celów testu. Jeżeli wykorzystuje się alternatywny rozpuszczalnik, należy określić:

— rozpuszczalność badanej substancji chemicznej, forskoliny i prochlorazu w rozpuszczalniku, oraz

— cytotoksyczność jako funkcję stężenia rozpuszczalnika.

Zaleca się, aby maksymalne dopuszczalne stężenie rozpuszczalnika nie przekraczało 10-krotnej wartości rozcieńczenia najmniej cytotoksycznego stężenia rozpuszczalnika.

27. Przed przeprowadzeniem badań po raz pierwszy laboratorium powinno wykonać doświadczenie kwalifikujące, mające na celu wykazanie, że laboratorium posiada zdolność do utrzymania i uzyskania odpowiedniej kultury komórkowej i warunków doświadczalnych wymaganych do celów badań substancji chemicznych, jak opisano w pkt 33–35.

28. Rozpoczynając badania z wykorzystaniem nowej partii, należy przeprowadzić analizę płytki kontrolnej przed zastosowaniem nowej partii komórek do oceny efektywności komórek, jak opisano w pkt 36 i 37.

Sprawność systemu pomiaru hormonów

Czułość, dokładność, precyzja i reaktywność krzyżowa metody wraz z przykładową matrycą

29. Każde laboratorium może stosować dowolny system pomiaru hormonów do celów analizy produkcji T i E2 przez komórki H295R, pod warunkiem że spełnia on wymogi w zakresie sprawności, w tym wymogi dotyczące granicy oznaczalności (LOQ). Nominalnie granice te wynoszą 100 pg/ml dla T i 10 pg/ml dla E2 i opierają się na podstawowych poziomach hormonów zaobserwowanych podczas badań walidacyjnych. Wyższe lub niższe poziomy mogą być jednak odpowiednie w zależności od podstawowych poziomów hormonów, jakie uzyskano w laboratorium przeprowadzającym badania. Przed rozpoczęciem analizy płytki kontroli jakości i prób badawczych laboratorium powinno wykazać, że za pomocą planowanego test hormonów można dokonywać pomiaru stężeń hormonów w podłożu wzbogaconym z wystarczającą dokładnością i precyzją, tak aby spełnić kryteria w zakresie kontroli jakości określone w tabelach 1 i 5, poprzez dokonanie analizy podłoża wzbogaconego uzupełnionego o substancję do wewnętrznej kontrolni hormonów. Podłoże wzbogacone należy uzupełnić o co najmniej trzy stężenia każdego hormonu (np. 100, 500 i 2 500 pg/ml T; 10, 50 i 250 pg/ml E2; lub można użyć najniższych możliwych stężeń na podstawie granic wykrywalności wybranego systemu pomiaru hormonów w odniesieniu do najniższych uzupełniających stężeń T i E2), a następnie poddać analizie. Zmierzone stężenia hormonów z nieekstrahowanych próbek powinny wynosić około 30 % stężeń nominalnych, a zmienność między pomiarami kontrpróbek z tej samej próbki nie powinna przekraczać 25 % (aby uzyskać dodatkowe kryteria w zakresie kontroli jakości, zob. także tabela 8). Jeżeli powyższe kryteria w zakresie kontroli jakości zostaną spełnione, przyjmuje się, że wybrany test pomiaru hormonów jest wystarczająco dokładny i precyzyjny i nie wchodzi w reakcję krzyżową ze składnikami podłoża (przykładowa matryca) w taki sposób, że można byłoby oczekiwać istotnego wpływu na wynik testu. W związku z tym nie wymaga się ekstrakcji próbek przed dokonaniem pomiaru hormonów.

30. Jeżeli kryteria w zakresie kontroli jakości przedstawione w tabelach 1 i 8 nie zostaną spełnione, może nastąpić istotny wpływ na matrycę i wówczas należy przeprowadzić doświadczenie z ekstrahowanym podłożem uzupełnionym. Przykład procedury ekstrakcji przedstawiono w dodatku II do sprawozdania z walidacji (4). Pomiary stężeń hormonów w ekstrahowanych próbkach należy przeprowadzić trzykrotnie ([1]). Jeżeli można wykazać, że po dokonaniu ekstrakcji składniki podłoża nie zakłócają metody wykrywania hormonów zgodnie z kryteriami w zakresie kontroli jakości, wszelkie dalsze doświadczenia należy przeprowadzać przy użyciu ekstrahowanych próbek. Jeżeli po dokonaniu ekstrakcji kryteria kontroli jakości nie mogą zostać spełnione, stosowany system pomiaru hormonów nie jest odpowiedni do testu steroidogenezy H295R i należy wykorzystać inną metodę wykrywania hormonów.

Krzywa wzorcowa

31. Stężenia hormonów w kontroli rozpuszczalnika (KR) powinny mieścić się w zakresie liniowym krzywej wzorcowej. Pożądane jest, aby wartości KR znalazły się w pobliżu środkowej części zakresu liniowego, dzięki czemu możliwy będzie pomiar wywołania i zahamowania syntezy hormonów. Należy odpowiednio wybrać rozcieńczenia podłoża (lub ekstraktów), które mają zostać zmierzone. Zależność liniową należy określić przy zastosowaniu odpowiedniego podejścia statystycznego.

Badanie interferencji chemicznej

32. W przypadku gdy do pomiaru hormonów mają zostać zastosowane testy oparte na przeciwciałach, takie jak testy immunoenzymatyczne (ELISA) i metody radioimmunologiczne (RIA), każdą substancję chemiczną należy zbadać pod kątem potencjalnej interferencji z systemem pomiaru hormonów, który ma zostać wykorzystany, przed rozpoczęciem faktycznego badania substancji chemicznych (dodatek III do sprawozdania z walidacji (4)), ponieważ niektóre substancje chemiczne mogą zakłócać wspomniane badania (17). W przypadku wystąpienia interferencji na poziomie ≥ 20 % podstawowej produkcji hormonów w odniesieniu do T lub E2, jak określono na podstawie analizy hormonów, należy przeprowadzić badanie interferencji chemicznej dla testu hormonów (jak

([1]) *Uwaga:* Jeżeli ekstrakcja jest wymagana, dokonuje się trzech kontrpomiarów w odniesieniu do każdego ekstraktu. Każda próbka zostanie poddana ekstrakcji tylko raz.

opisano w sekcji 5.0 dodatku III do sprawozdania z walidacji (4)) w odniesieniu do wszystkich rozcieńczeń roztworów wyjściowych substancji chemicznych w celu zidentyfikowania progu dawki, przy której występuje istotna interferencja (≥ 20 %). Jeżeli interferencja nie przekracza 30 %, wyniki można skorygować o wartość tej interferencji. Jeżeli interferencja przekracza 30 %, otrzymane dane są nieważne i należy odrzucić dane dotyczące odnośnych stężeń. Jeżeli istotna interferencja badanej substancji chemicznej z systemem pomiaru hormonów wystąpi w przypadku więcej niż jednego niecytotoksycznego stężenia, należy zastosować inny system pomiaru hormonów. W celu uniknięcia interferencji wynikającej z zanieczyszczania substancji chemicznych zaleca się dokonywanie ekstrakcji hormonów z podłoża za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika; możliwe metody przedstawiono w sprawozdaniu z walidacji (4).

Tabela 1

Kryteria sprawności w odniesieniu do systemów pomiaru hormonów

Parametr	Kryterium
Czułość metody pomiaru	Granica oznaczalności (LOQ) T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a]
Efektywność ekstrakcji hormonów (jedynie w przypadku, gdy ekstrakcja jest konieczna)	Średnie wskaźniki odzysku (na podstawie trzykrotnych pomiarów) w odniesieniu do dodanych ilości hormonów nie powinny odbiegać o więcej niż 30 % od ilości, która została dodana.
Interferencja chemiczna (jedynie w przypadku systemów opartych na przeciwciałach)	Nie powinna nastąpić istotna (≥ 30 % podstawowej produkcji odpowiedniego hormonu) reakcja krzyżowa z żadnym hormonem produkowanym przez komórki [b] [c]

[a] *Uwaga:* Granice pomiaru metody ustalono na podstawie podstawowych wartości dotyczących produkcji hormonów przedstawionych w tabeli 5 i zależą one od wyników. Jeżeli możliwe jest otrzymanie większej podstawowej produkcji hormonów, granica może być wyższa.

[b] Niektóre przeciwciała T i E2 mogą wchodzić w reakcję krzyżową odpowiednio z androstenedionem i estronem przy wyższej zawartości procentowej. W takich przypadkach dokładne określenie wpływu na 17β-hydroksysteroid nie jest możliwe. Uzyskane dane mogą jednak w dalszym ciągu stanowić źródło przydatnych informacji na temat ogólnego wpływu na produkcję estrogenu lub androgenu. W takich przypadkach dane należy wyrazić jako reakcje androgenowe/estrogenowe, a nie reakcje 17β-estradiolowe i testosteronowe.

[c] Obejmują one: cholesterol, pregnenolon, progesteron, 11-deoksykortykosteron, kortykosteron, aldosteron, 17α-pregnenolon, 17α-progesteron, deoksykortyzol, kortyzol, dehydroepiandrosteron, androstenedion i estron.

Badanie biegłości laboratorium

33. Przed rozpoczęciem badania nieznanych substancji chemicznych laboratorium powinno wykazać zdolność do uzyskania i utrzymywania odpowiedniej kultury komórkowej i odpowiednich warunków badań, wymaganych do skutecznego przeprowadzenia testu, wykonując badanie biegłości laboratorium. Ponieważ wynik testu bezpośrednio zależy od pracowników laboratorium przeprowadzających test, procedury te należy częściowo powtarzać, jeżeli nastąpi zmiana personelu laboratorium.

34. Takie badanie biegłości zostanie przeprowadzone w takich samych warunkach jak warunki wymienione w pkt 38–40, poprzez narażenie komórek na 7 zwiększanych stężeń substancji o silnym, umiarkowanym i słabym działaniu wywołującym i hamującym oraz substancji kontroli ujemnej (zob. tabela 2). Badane substancje chemiczne obejmują w szczególności forskolinę o silnym działaniu wywołującym (nr CAS 66575-29-9); prochloraz o silnym działaniu hamującym (nr CAS 67747-09-5); atrazynę o umiarkowanym działaniu wywołującym (nr CAS 1912-24-9); aminoglutetymid o umiarkowanym działaniu hamującym (nr CAS 125-84-8); bisfenol A o słabym działaniu wywołującym (produkcja E2) i słabym działaniu hamującym (produkcja T) (nr CAS 80-05-7); oraz ludzką gonadotropinę kosmówkową (hCG) do kontroli ujemnej (nr CAS 9002-61-3), jak przedstawiono w tabeli 2. Dla wszystkich substancji chemicznych stosuje się oddzielne płytki zgodnie ze schematem przedstawionym w tabeli 6. Jedną płytkę kontroli jakości (pkt 36–37, tabela 4) należy dołączyć do każdej próby dziennej w odniesieniu do substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości.

Tabela 2

Substancje chemiczne przeznaczone do oceny biegłości i stężeń narażenia

Substancja chemiczna przeznaczona do oceny biegłości	Badane stężenia [μM]
Prochloraz	0 [a]; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10
Forskolina	0 [a]; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30

Substancja chemiczna przeznaczona do oceny biegłości	Badane stężenia [μM]
Atrazyna	0 [a]; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Aminoglutetymid	0 [a]; 0,03; 0,1; 1; 3; 10; 30; 100
Bisfenol 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] Kontrola (0) rozpuszczalnika (DMSO), 1 μl DMSO/dołek

Podczas badania biegłości laboratorium poddanie komórek H295R działaniu substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości należy przeprowadzać przy użyciu płytek 24-dołkowych. Dawkowanie w odniesieniu do wszystkich dawek badanych substancji chemicznych wyraża się w μM. Należy podawać dawki w DMSO o stężeniu 0,1 % v/v na dołek. Wszystkie badane stężenia należy badać z zastosowaniem trzech dołków dla każdego poziomu stężenia (tabela 6). W odniesieniu do każdej substancji chemicznej stosuje się oddzielne płytki. Jedną płytkę kontroli jakości dołącza się do każdej próby dziennej.

35. Analizę żywotności komórek i analizę hormonów należy przeprowadzać zgodnie z opisem zawartym w pkt 42–46. Wartość progową (najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, LOEC) i decyzję dotyczącą klasyfikacji należy odnotować i porównać z wartościami przedstawionymi w tabeli 3. Dane uznaje się za dopuszczalne, jeżeli spełniają wymogi w zakresie LOEC i klasyfikacji decyzji przedstawione w tabeli 3.

Tabela 3

Wartości progowe (LOEC) i klasyfikacje decyzji w odniesieniu do substancji chemicznych przeznaczonych do oceny biegłości

	Nr CAS	LOEC [μM]		Klasyfikacja decyzji	
		T	E2	T	E2
Prochloraz	67747-09-5	≤ 0,1	≤ 1,0	+ [a] (zahamowanie)	+ (zahamowanie)
Forskolina	66575-29-9	≤ 10	≤ 0,1	+ (indukcja)	+ (indukcja)
Atrazyna	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (indukcja)	+ (indukcja)
Aminoglutetymid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (zahamowanie)	+ (zahamowanie)
Bisfenol A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (zahamowanie)	+ (indukcja)
hCG	9002-61-3	Nie dotyczy	Nie dotyczy	ujemna	ujemna

[a] +, dodatnia

Nie dotyczy: nie dotyczy, ponieważ nie oczekuje się wystąpienia zmian po narażeniu na niecytotoksyczne stężenia substancji kontroli ujemnej.

Płytka kontroli jakości

36. Płytkę kontroli jakości (QC) stosuje się w celu zweryfikowania efektywności komórek H295R w standardowych warunkach hodowli oraz utworzenia historycznej bazy danych stężeń hormonów w kontrolach rozpuszczalnika, kontrolach dodatnich i ujemnych, jak również innych pomiarów kontroli jakości w czasie:

— efektywność komórek H295R należy oceniać, stosując płytkę kontroli jakości dla każdej nowej partii ATCC lub po wykorzystaniu uprzednio zamrożonego zapasu komórek po raz pierwszy, chyba że przeprowadzono badanie biegłości laboratorium (pkt 32–34) przy użyciu tej partii komórek,

— płytka kontroli jakości pozwala na kompleksową ocenę warunków testu (np. żywotności komórek, kontroli rozpuszczalnika, kontroli ujemnych i dodatnich oraz zmienności w obrębie testów i między testami) podczas badania substancji chemicznych i powinna stanowić część każdej próby badawczej.

37. Badanie w zakresie kontroli jakości przeprowadza się przy użyciu płytki 24-dołkowej i zgodnie z tymi samymi procedurami dotyczącymi inkubacji, dawkowania, żywotności/cytotoksyczności komórek, ekstrakcji hormonów i analizy hormonów, które opisano w pkt 38–46 w odniesieniu do badania substancji chemicznych. Płytka kontroli jakości zawiera próby ślepe, kontrole rozpuszczalnika oraz dwa stężenia znanej substancji indukcyjnej (forskolinę,

1, 10 μM) i inhibitora (prochloraz, 0,1, 1 μM) syntezy E2 i T. Ponadto w wybranych dołkach stosuje się MeOH jako kontrolę dodatnią w teście żywotności/cytotoksyczności. Szczegółowy opis układu płytki przedstawiono w tabeli 4. Kryteria, które należy spełnić w odniesieniu do płytki kontroli jakości, wymieniono w tabeli 5. Zarówno w przypadku dołków kontroli rozpuszczalnika, jak i dołków próby ślepej należy spełnić wymogi dotyczące minimalnej podstawowej produkcji hormonów w odniesieniu do T i E2.

Tabela 4

Układ płytki kontroli jakości do celów badania efektywności nienarażonych komórek H295R i komórek narażonych na działanie znanych inhibitorów (PRO = prochloraz) i stymulatorów (FOR = forskolina) produkcji E2 i T. Po zakończeniu narażenia i usunięciu podłoża do wszystkich dołków zawierających MeOH dodany zostanie 70-procentowy roztwór metanolu, służący jako kontrola dodatnia dla cyctotoksyczności (zob. test cytotoksyczności w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4))

	1	2	3	4	5	6
A	Próba ślepa [a]	Próba ślepa [a]	Próba ślepa [a]	Próba ślepa [a] (+ MeOH) [b]	Próba ślepa [a] (+ MeOH) [b]	Próba ślepa [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] Komórki w dołkach próby ślepej otrzymują jedynie podłoże (tj. nie otrzymują rozpuszczalnika).
[b] Metanol (MeOH) zostanie dodany **po** zakończeniu narażenia i usunięciu podłoża z tych dołków.
[c] DMSO kontrola rozpuszczalnika (1 μl/dołek).

Tabela 5

Kryteria efektywności w odniesieniu do płytki kontroli jakości

	T	E2
Podstawowa produkcja hormonów w kontroli rozpuszczalnika	≥ 5-krotność granicy oznaczalności	≥ 2,5-krotność granicy oznaczalności
Indukcja (10 μM forskoliny)	≥ 1,5-krotność kontroli rozpuszczalnika	≥ 7,5-krotność kontroli rozpuszczalnika
Zahamowanie (1μM prochlorazu)	≤ 0,5-krotność kontroli rozpuszczalnika	≤ 0,5-krotność kontroli rozpuszczalnika

PROCEDURA NARAŻENIA NA SUBSTANCJE CHEMICZNE

38. Komórki preinkubowane usuwa się z inkubatora (pkt 21) i sprawdza się je pod mikroskopem, aby upewnić się, że są one w dobrym stanie (łączenie, morfologia), zanim rozpocznie się dawkowanie.

39. Komórki umieszcza się w szafce zapewniającej bezpieczeństwo biologiczne, a następnie usuwa się podłoże wzbogacone i zastępuje się je nowym podłożem wzbogaconym (1 ml/dołek). Do celów tej metody preferowanym rozpuszczalnikiem jest DMSO. Jeżeli istnieją jednak względy przemawiające za zastosowaniem innych rozpuszczalników, należy przedstawić uzasadnienie naukowe. Komórki naraża się na działanie badanej substancji chemicznej poprzez dodanie 1 μl odpowiedniego roztworu podstawowego w DMSO (zob. dodatek II do sprawozdania z walidacji (4)) na 1 ml podłoża wzbogaconego (objętość dołka). Dzięki temu uzyskuje się stężenie

końcowe w dołkach na poziomie 0,1 % DMSO. Aby zapewnić odpowiednie mieszanie, zaleca się zasadniczo zmieszanie odpowiedniego roztworu podstawowego badanej substancji chemicznej w DMSO z podłożem wzbogaconym celem uzyskania pożądanego stężenia końcowego dla każdej dawki oraz dodanie mieszaniny do każdego dołka natychmiast po usunięciu starego podłoża. W przypadku zastosowania tego wariantu należy zachować jednakowe stężenie DMSO (0,1 %) we wszystkich dołkach. Dołki zawierające dwa największe stężenia ocenia się wzrokowo przy użyciu mikroskopu stereoskopowego pod kątem tworzenia się osadów lub zmętnienia, które stanowią wskaźniki niepełnego rozpuszczenia się badanej substancji chemicznej. W przypadku zaobserwowania takich zjawisk (zmętnienia, tworzenia się osadów) badaniu poddaje się także dołki zawierające kolejne niższe stężenia (itd.), a stężenia, które nie przekształciły się w pełni w roztwór, należy wyłączyć z dalszej oceny i analizy. Płytkę ponownie umieszcza się na 48 godzin w inkubatorze w temperaturze 37 °C w warunkach, w których zawartość CO_2 w powietrzu wynosi 5 %. Układ płytki zawierającej badaną substancję chemiczną przedstawiono w tabeli 6. Roztwory podstawowe 1–7 przedstawiają rozmieszczenie rosnących dawek badanej substancji chemicznej.

Tabela 6

Schemat dawkowania przy poddawaniu komórek H295R działaniu badanej substancji chemicznej na płytce 24-dołkowej

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

40. Po upływie 48 godzin płytki poddane działaniu substancji chemicznych wyjmuje się z inkubatora i sprawdza się każdy dołek pod mikroskopem pod kątem stanu komórek (łączenie, morfologia, poziom konfluencji) i oznak cytotoksyczności. Podłoże z każdego dołka dzieli się na dwie równe części (po około 490 µl) i umieszcza się w dwóch oddzielnych, odpowiednio oznakowanych fiolkach (tj. jeden alikwot jako zapasowa próbka dla każdego dołka). Aby zapobiec wysychaniu komórek, podłoże usuwa się stopniowo, wyjmując za każdym razem jeden rząd lub jedną kolumnę, i zastępuje podłożem służącym do testu żywotności/cytotoksyczności komórek. Jeżeli nie planuje się natychmiastowego pomiaru żywotności/cytotoksyczności komórek, do każdego dołka należy dodać 200 µl PBS zawierającego Ca^{2+} i Mg^{2+}. Podłoża zamraża się w temperaturze – 80 °C aż do dalszego przetwarzania celem dokonania analizy stężeń hormonów (zob. pkt 44–46). Podczas gdy T i E2 w podłożu przechowywanym w temperaturze – 80 °C są ogólnie stabilne przez co najmniej 3 miesiące, stabilność hormonów w trakcie przechowywania należy dokumentować w obrębie każdego laboratorium.

41. Natychmiast po usunięciu podłoża należy dokonać oznaczenia żywotności/cytotoksyczności komórek dla każdej płytki poddawanej działaniu substancji chemicznej.

Oznaczanie żywotności komórek

42. W celu określenia potencjalnego wpływu badanej substancji chemicznej na żywotność komórek można wykorzystać dowolny test żywotności/cytotoksyczności komórek. Dany test powinien umożliwić uzyskanie prawdziwej miary wartości procentowej żywotnych komórek obecnych w dołku lub powinien pozwolić na wykazanie, że jest bezpośrednio porównywalny do (funkcji liniowej) testu Live/Dead® (zob. dodatek III do sprawozdania z walidacji (4)). Test cytotoksyczności MTT [bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazoliowego] (18) stanowi alternatywny test, w przypadku którego wykazano równie skuteczne działanie. Ocena żywotności komórek przy zastosowaniu powyższych metod stanowi względny pomiar, który niekoniecznie wskazuje na obecność liniowych zależności z bezwzględną liczbą komórek w dołku. W związku z tym badacz powinien przeprowadzić równoległą, subiektywną ocenę wzrokową każdego dołka oraz wykonać cyfrowe zdjęcia kontroli rozpuszczalnika i dwóch najwyższych stężeń niecytotoksycznych i umieścić je w archiwum, aby umożliwić późniejszą ocenę faktycznej gęstości komórek, jeżeli będzie to wymagane. Jeżeli poprzez ocenę wzrokową lub po wykazaniu w drodze testu żywotności/cytotoksyczności komórek, wydaje się, że następuje wzrost liczby komórek, należy dokonać weryfikacji tego pozornego wzrostu. Jeżeli wzrost liczby komórek zostanie potwierdzony, należy odnotować to w sprawozdaniu z badania. Żywotność komórek będzie wyrażona w stosunku do średniej reakcji kontroli rozpuszczalnika, uznanych za komórki w 100 % żywotne i oblicza się ją w sposób odpowiedni dla stosowanej metody testu żywotności/cytotoksyczności. W przypadku testu cytotoksyczności MTT, można zastosować następujący wzór:

% żywotnych komórek = (reakcja w dołku – średnia reakcja w dołkach, w których podawano MeOH [= 100 % martwych] – (średnia reakcja w dołkach zawierających kontrole rozpuszczalnika – średnia reakcja w dołkach, w których podawano MeOH [= 100 % martwych]

43. Danych pochodzących z dołków o żywotności poniżej 80 % w stosunku do średniej żywotności w kontrolach rozpuszczalnika (= 100 % żywotności) nie należy uwzględniać w ostatecznej analizie danych. Zahamowanie steroidogenezy występujące w przypadku około 20-procentowej cytotoksyczności należy oceniać w sposób ostrożny, aby mieć pewność, że cytotoksyczność nie była przyczyną zahamowania.

Analiza hormonów

44. W każdym laboratorium można stosować dowolny system pomiaru hormonów do celów analizy T i E2. Zapasowe alikwoty podłoża z każdej grupy badanej mogą zostać wykorzystane do sporządzenia rozcieńczeń, aby sprowadzić stężenie do liniowej części krzywej wzorcowej. Jak opisano w pkt 29, każde laboratorium powinno wykazać zgodność stosowanego systemu pomiaru hormonów (np. ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) z kryteriami kontroli jakości poprzez dokonanie analizy podłoża wzbogaconego uzupełnionego o substancję do wewnętrznej kontrolni hormonów przed przeprowadzeniem prób kontroli jakości lub testów substancji chemicznych. W celu zapewnienia, że składniki systemu badań nie zakłócają pomiaru hormonów, może zajść potrzeba ekstrakcji hormonów z podłoży przed dokonaniem ich pomiaru (w celu uzyskania informacji dotyczących warunków, w których ekstrakcja jest lub nie jest wymaga, zob. pkt 30). Zaleca się przeprowadzenie ekstrakcji zgodnie z procedurami przedstawionymi w dodatku III do sprawozdania z walidacji (4).

45. Jeżeli do pomiaru hormonów wykorzystuje się dostępny na rynku zestaw do przeprowadzania badań, analizy hormonów należy dokonywać, stosując się do instrukcji dołączonych przez producenta zestawu do przeprowadzania badań. Większość producentów stosuje swoiste procedury, zgodnie z którymi należy przeprowadzać analizy. Rozcieńczenia próbek należy dostosować w taki sposób, aby oczekiwane stężenia hormonów dla kontroli rozpuszczalnika mieściły się w środkowej części liniowego zakresu krzywej wzorcowej dla pojedynczego testu (dodatek III do sprawozdania z walidacji (4)). Wartości znajdujące się poza liniowym zakresem krzywej wzorcowej należy odrzucić.

46. Ostateczne stężenia hormonów oblicza się w następujący sposób:

Przykład:

ekstrahowane:	450 µl podłoża
odtworzone w:	250 µl buforu testowy
rozcieńczenie w teście:	1:10 (aby próbka mieściła się w zakresie liniowym krzywej wzorcowej)
stężenie hormonów w teście:	150 pg/ml (po dostosowaniu do stężenia na ml testowanej próbki)
odzysk:	89 %
ostateczne stężenie hormonów =	(stężenie hormonów (na ml) ÷ odzysk) (współczynnik rozcieńczenia)
ostateczne stężenie hormonów =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

Dobór badanych stężeń

47. W ramach testu należy przeprowadzić co najmniej dwie niezależne próby. Jeżeli wcześniejsze dane, takie jak informacje dotyczące granic rozpuszczalności lub cytotoksyczności, nie stanowią podstawy doboru badanych stężeń, zaleca się rozmieszczenie badanych stężeń do celów próby wstępnej w podziałce logarytmicznej $\log_{10}$ z maksymalnym stężeniem w wysokości 10^{-3} M. Jeżeli substancja chemiczna jest rozpuszczalna i nie wykazuje właściwości cytotoksycznych przy żadnym badanym stężeniu, a wynik pierwszej próby w ramach testu był ujemny,

należy to potwierdzić, przeprowadzając jeszcze jedną próbę w takich samych warunkach, w jakich przeprowadzono pierwszą próbę (tabela 7). Jeżeli wyniki pierwszej próby są *niejednoznaczne* (tj. zmiana krotności jest istotna statystycznie w przypadku kontroli rozpuszczalnika przy wyłącznie jednym stężeniu) lub dodatnia (tj. zmiana krotności przy dwóch lub większej liczbie sąsiadujących stężeń jest istotna statystycznie), należy powtórzyć badanie, jak wskazano w tabeli 7, poprzez dostosowanie wybranych badanych stężeń. Badane stężenia w próbie drugiej i trzeciej (w razie potrzeby) należy dostosować na podstawie wyników próby wstępnej, ograniczając stężenia, które wywołały działanie, przy zastosowaniu zakresu stężeń w wysokości 1/2-log (np. jeżeli wynikiem pierwotnej próby obejmującej 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 μM były indukcje przy wartościach 1 i 10 μM, w drugiej próbie należy użyć badanych stężeń w wysokości 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), chyba że konieczne będzie zastosowanie niższych stężeń, aby osiągnąć LOEC. W ostatnim przypadku w drugiej próbie należy użyć co najmniej pięciu stężeń poniżej najniższego stężenia badanego w pierwszej próbie, stosując zakres skalę logarytmiczną 1/2-log. Jeżeli druga próba nie potwierdzi wyników uzyskanej w pierwszej próbie (tj. nie nastąpi istotność statystyczna przy wcześniej badanych stężeniach, które osiągnęły wynik dodatni ± 1 przyrost stężenia), należy przeprowadzić trzecie doświadczenie z zastosowaniem pierwotnych warunków badania. Niejednoznaczne wyniki uzyskane w pierwszej próbie uznaje się za ujemne, jeżeli zaobserwowany wpływ może zostać potwierdzony w którejkolwiek z kolejnych dwóch prób. Niejednoznaczne wyniki uznaje się za dodatnie reakcje (dodatni wpływ), jeżeli reakcje te mogą zostać potwierdzone w co najmniej jeszcze jednej próbie i mieszczą się w zakresie ± 1 przyrost stężenia (aby uzyskać informacje dotyczące procedury interpretacji danych zob. pkt 55).

Tabela 7

Matryca decyzji w odniesieniu do możliwych scenariuszy wyników

Próba 1	Próba 2		Próba 3		Decyzja	
Scenariusz	Decyzja	Scenariusz	Decyzja	Scenariusz	Wynik dodatni	Wynik ujemny
Wynik ujemny	Potwierdzić [a]	Wynik ujemny	Zatrzymać			X
Wynik ujemny	Potwierdzić [a]	Wynik dodatni	Dostosować [b]	Wynik ujemny		X
Wynik niejednoznaczny [c]	Dostosować [b]	Wynik ujemny	Potwierdzić [a]	Wynik ujemny		X
Wynik niejednoznaczny [c]	Dostosować [b]	Wynik ujemny	Potwierdzić [a]	Wynik dodatni	X	
Wynik niejednoznaczny [c]	Dostosować [b]	Wynik dodatni			X	
Wynik dodatni	Dostosować [b]	Wynik ujemny	Potwierdzić [a]	Wynik dodatni	X	
Wynik ujemny	Potwierdzić [a]	Wynik dodatni	Dostosować [b]	Wynik dodatni	X	
Wynik ujemny	Dostosować [b]	Wynik dodatni	Zatrzymać		X	

[a] Należy potwierdzić poprzednią próbę, stosując ten sam schemat badań.
[b] Należy powtórzyć test, stosując rozkład stężeń w skali logarytmicznej 1/2-log (ograniczanie stężenia, które w poprzednim badaniu dało wynik różniący się w znacznym stopniu).
[c] Zmiana krotności przy jednym stężeniu jest istotnie statystycznie różna od KR.

Kontrola jakości płytki do badań

48. Poza spełnieniem kryteriów mających zastosowanie do płytki kontroli jakości, należy spełnić również inne kryteria jakości, przedstawione w tabeli 8, które dotyczą dopuszczalnej zmienności między odtwarzanymi dołkami, odtwarzanych eksperymentów, liniowości i czułości systemów pomiaru hormonów, zmienności między odtwarzanymi pomiarami hormonów w tej samej próbce oraz odzysk wzbogaceń hormonami wyrażony w procentach po ekstrakcji podłoża (w stosownych przypadkach; aby uzyskać szczegółowe informacje na temat wymogów w zakresie ekstrakcji zob. pkt 30). Dane powinny zawierać się w dopuszczalnych zakresach zdefiniowanych w odniesieniu do każdego parametru, aby można je było uwzględnić w dalszej ocenie. Jeżeli kryteria te nie zostaną spełnione, w arkuszu kalkulacyjnym należy odnotować, że kryteria kontroli jakości nie zostały spełnione w odniesieniu do danej próbki oraz że należy dokonać ponownej analizy tej próbki lub usunąć ją ze zbioru danych.

Tabela 8

Dopuszczalne zakresy lub dopuszczalna zmienność (%) w odniesieniu do parametrów płytki do badań w teście komórek H295R

(LOQ: granica oznaczalności systemu pomiaru hormonów. CV: współczynnik zmienności; KR: kontrola rozpuszczalnika; DPM: liczba rozpadów na minutę)

	Porównanie	T	E2
Podstawowa produkcja hormonów w kontrolach rozpuszczalnika	Krotność wyższa niż LOQ	≥ 5-ciokrotna	≥ 2,5-krotna
Badanie narażenia — w ramach współczynnika zmienności płytki w odniesieniu do kontroli rozpuszczalnika (odtwarzane dołki)	Stężenia bezwzględne	≤ 30 %	≤ 30 %
Badanie narażenia — między współczynnikiem zmienności płytki w odniesieniu do kontroli rozpuszczalnika (odtwarzane doświadczenia)	Zmiana krotności	≤ 30 %	≤ 30 %
System pomiaru hormonów — czułość	Wykrywalny krotny spadek w stosunku do kontroli rozpuszczalnika	≥ 5-krotna	≥ 2,5-krotna
System pomiaru hormonów — powtórzony pomiar współczynnika zmienności w odniesieniu do kontroli rozpuszczalnika [a]	Stężenia bezwzględne	≤ 25 %	≤ 25 %
Ekstrakcja podłoża — odzysk standardu wewnętrznego 3H (w razie potrzeby)	Liczba rozpadów na minutę	≥ 65 % nominalnie	

[a] Odnosi się do powtrzanych pomiarów tej samej próbki.

ANALIZA DANYCH I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Analiza danych

49. Aby dokonać oceny względnego wzrostu/spadku chemicznie zmienionej produkcji hormonów, wyniki należy znormalizować do średniej wartości KR każdej płytki do badań, a wyniki wyrazić jako zmiany względem kontroli rozpuszczalnika w każdej badanej płytce. Wszystkie dane należy wyrażać jako średnia ± 1 odchylenie standardowe (SD).

50. W analizie danych należy uwzględnić jedynie dane dotyczące hormonów z dołków, w których cytotoksyczność nie przekroczyła poziomu 20 %. Względne zmiany należy obliczać w następujący sposób:

Względna zmiana = (stężenie hormonów w każdym dołku) ÷ (średnie stężenie hormonów we wszystkich dołkach kontroli rozpuszczalnika).

51. Jeżeli poprzez kontrolę wzrokową dołka lub po wykazaniu w drodze testu żywotności/cytotoksyczności komórek opisanego w pkt 42 wydaje się, że następuje wzrost liczby komórek, należy dokonać weryfikacji tego pozornego wzrostu. Jeżeli wzrost liczby komórek zostanie potwierdzony, należy odnotować to w sprawozdaniu z badania.

52. Przed przeprowadzeniem analizy statystycznej należy dokonać oceny założeń dotyczących normalności i jednorodności zmienności. Oceny normalności należy dokonywać, stosując standardowe wykresy prawdopodobieństwa lub inną właściwą metodę statystyczną (np. test Shapiro-Wilka). Jeżeli dane (zmiany krotności) nie posiadają rozkładu normalnego, należy dokonać próby transformacji danych, aby zbliżyć je do rozkładu normalnego. Jeżeli dane posiadają rozkład normalny lub rozkład zbliżony do normlanego, należy dokonać analizy różnic między grupami stężeń substancji chemicznych i KR, stosując test parametryczny (np. test Dunnetta), w którym *stężenie* jest zmienną niezależną, a *reakcja* (zmiana krotności) jest zmienną zależną. Jeżeli dane nie posiadają rozkładu normalnego należy zastosować odpowiedni test nieparametryczny (np. test Kruskala-Wallisa, test sum rang Steele'a). Różnice uznaje się za istotne przy wartości $p \leq 0{,}05$. Statystycznych ocen dokonuje się w oparciu o średnie wartości dotyczące każdego dołka, które stanowią niezależne elementy danych. Oczekuje się, że z uwagi na znaczne przedziały między dawkami podczas pierwszej próby (skala logarytmiczna $\log_{10}$), w wielu przypadkach nie będzie możliwe określenie wyraźnych związków stężenie-reakcja, w przypadku których dwie największe dawki znajdą się w liniowej części krzywej sigmoidalnej. W związku z tym, dokonując pierwszej próby lub przy zastosowaniu wszelkich innych zbiorów danych, w przypadku których ten warunek zaistnieje (np. w przypadku, w którym nie można oszacować maksymalnego poziomu skuteczności), stosuje się statystykę stałych zmiennych typu I, jak opisano powyżej.

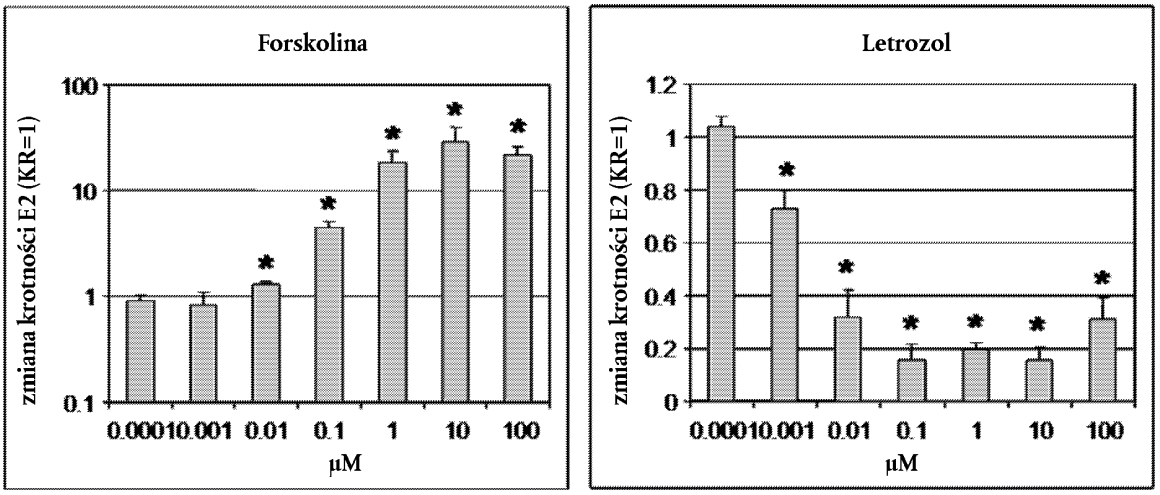
53. Jeżeli w liniowej części krzywej znajduje się większa liczba elementów danych niż dwa i w przypadku, gdy można obliczyć maksymalne poziomy skuteczności, czego oczekuje się w odniesieniu do niektórych z drugich prób przeprowadzanych przy zastosowaniu półlogarytmicznej skali przedziału stężeń ekspozycyjnych, do obliczenia skutecznych stężeń (np.EC50 i EC20) należy wykorzystać model probitowy, logitowy lub inny właściwy model regresji.

54. Wyniki należy przedstawić w formie graficznej (wykresu słupkowego przedstawiającego średnią +/– 1 odchylenie standardowe) i w formie tabeli (zawierającej LOEC/NOEC, kierunek działania i siłę maksymalnej reakcji, będącej częścią porcji danych dawka-odpowiedź) (przykład przedstawiono na rys. 3). Ocenę danych uznaje się za ważną, wyłącznie jeżeli dokonano jej na podstawie co najmniej dwóch niezależnie przeprowadzonych prób. Uznaje się, że badanie lub próba są niezależne, jeżeli zostały przeprowadzone w różnych terminach z zastosowaniem nowego zestawu roztworów i kontroli. Zakres stężeń, jakiego użyto w próbach 2 i 3 (w razie potrzeby), może zostać dostosowany na podstawie wyników próby 1, aby lepiej zdefiniować zakres reakcji na dawkę zawierający LOEC (zob. pkt 47).

Rysunek 3

Przykład przedstawienia i oceny danych otrzymanych w trakcie testu H295R w postaci wykresu i tabeli

(Gwiazdką oznaczono istotne statystycznie różnice zaobserwowane w kontroli rozpuszczalnika (KR) ($p < 0,05$). LOEC: najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany; maksymalna zmiana: najwyższa siła reakcji zaobserwowana przy jakimkolwiek stężeniu w stosunku do średniej reakcji KR (= 1))



Substancja chemiczna	LOEC	Maksymalna zmiana
Forskolina	0,01	0,15-krotność
Letrozol	0,001	29-krotność

Procedura interpretacji danych

55. Uznaje się, że badana substancja chemiczna daje reakcję dodatnią, jeżeli krotność indukcji statystycznie różni się ($p \leq 0,05$) od kontroli rozpuszczalnika w dwóch sąsiadujących stężeniach w co najmniej dwóch niezależnych próbach (tabela 7). Uznaje się, że badana substancja chemiczna daje reakcją ujemną po przeprowadzeniu dwóch ujemnych prób lub w przypadku trzech prób obejmujących dwie próby ujemne i jedną niejednoznaczną lub dodatnią próbę. Jeżeli dane uzyskane podczas trzech niezależnych badań nie spełniają kryteriów decyzji wymienione w tabeli 7, wyniki badań nie nadają się do wykorzystania. Wyniki uzyskane przy stężeniach wykraczających poza granice rozpuszczalności lub przy stężeniach cytotoksycznych nie powinny być uwzględniane w interpretacji wyników.

Sprawozdanie z badania

56. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Placówka badawcza:

— nazwa placówki i lokalizacja,

— dane kierownika badań i pozostałych pracowników oraz opis ich obowiązków w zakresie badań,

— daty rozpoczęcia i zakończenia badań.

Badana substancja chemiczna, odczynniki i substancje kontrolne:

— tożsamość (nazwa/nr CAS w stosownych przypadkach), źródło, numer partii/serii, czystość, dostawca, właściwości badanej substancji chemicznej, odczynników i substancji kontrolnych,

— cechy fizyczne i stosowne właściwości fizykochemiczne badanej substancji chemicznej,

— opis warunków przechowywania oraz metody i częstotliwości przygotowywania badanych substancji chemicznych, odczynników i substancji kontrolnych,

— stabilność badanej substancji chemicznej.

Komórki:

— źródło i rodzaj komórek,

— liczbę pasaży komórek (identyfikator pasażu komórek) używanych w badaniu,

— opis procedur stosowanych do utrzymywania kultur komórkowych.

Wymogi przed rozpoczęciem badań (w stosownych przypadkach):

— opis i wyniki badania interferencji chemicznego testu hormonów,

— opis i wyniki pomiarów efektywności ekstrakcji hormonów,

— krzywą wzorcową i krzywą kalibracyjną dla wszystkich przeprowadzanych testów analitycznych,

— granice oznaczalności wybranych testów analitycznych.

Warunki badań:

— skład podłoży,

— stężenie badanej substancji chemicznej,

— gęstość komórek (szacowane lub mierzone stężenia komórek w 24 i 48 godzinie),

— rozpuszczalność badanej substancji chemicznej (granica rozpuszczalności, jeżeli została określona),

— czas inkubacji i warunki inkubacji.

Wyniki badań:

— nieprzetworzone dane w odniesieniu do każdego dołka kontroli i badanych substancji chemicznych — każdy powtórzony pomiar w postaci danych pierwotnych uzyskanych za pomocą narzędzi do pomiaru produkcji hormonów (np. gęstości optycznej, jednostek fluorescencji, liczby rozkładów na minutę itd.),

— walidację normalności lub uzasadnienie transformacji danych,

— średnie poziomy reakcji +/- 1 odchylenie standardowe w odniesieniu do każdego dołka, w którym dokonuje się pomiaru,

— dane dotyczące cytotoksyczności (badane stężenia, które spowodowały cytotoksyczność),

— potwierdzenie, że spełniono kryteria kontroli jakości,

— względna zmiana w stosunku do kontroli rozpuszczalnika skorygowana o cytotoksyczność,

— wykres słupkowy przedstawiający względne zmiany (zmiany krotności) przy każdym stężeniu, odchylenie standardowe oraz istotność statystyczna, co omówiono w pkt 49–54.

Interpretacja danych:

— należy zastosować procedurę interpretacji danych do wyników i omówić ustalenia.

Omówienie ustaleń:

— czy wyniki badania wskazują na jakiekolwiek możliwości, że na dane na temat T/E2 mogły wpłynąć pośrednie oddziaływania na szlak gluko- i minaralokortykoidowy?

Wnioski

LITERATURA

(1) OECD (2002), »OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals« w dodatku 2 do rozdziału B.54 niniejszego załącznika.

(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, s. 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 steroidgenesis 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, s. 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, Paryż, dostępny na stronie internetowej: [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, Paryż, dostęp na stronie internetowej: [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«, dostępny na stronie internetowej: http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/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, s. 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, s 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 731–737.

(16) Rozdział B.55 niniejszego załącznika: »Test biologiczny Hershbergera na szczurach: krótkoterminowe badanie przesiewowe właściwości (anty)androgennych«.

(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, s. 222–231.

(18) Mosmann, T. (1983), »Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays«, *J. Immunol. Methods.,* 65, s. 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, s. 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, s. 484–492.

Dodatek

DEFINICJE:

Konfluencja odnosi się do stopnia pokrycia lub rozrostu, na jaki pozwala się komórkom w podłożu.

Substancja chemiczna oznacza substancję lub mieszaninę.

CV odnosi się do współczynnika zmienności i oznacza stosunek odchylenia standardowego rozkładu do jego średniej arytmetycznej.

CYP oznacza monooksygenazy cytochromu P450, rodzinę genów i enzymów z nich produkowanych, które uczestniczą w katalizie szeregu różnych reakcji biochemicznych, w tym w syntezie i metabolizmie hormonów sterydowych.

DPM oznacza liczbę rozpadów na minutę. Jest to liczba atomów w danej ilości materiału radioaktywnego, która uległa rozpadowi w ciągu jednej minuty.

E2 to 17β-estradiol, najważniejszy estrogen w układach u ssaków.

Komórki **H295R** są ludzkimi komórkami raka nadnercza, które posiadają właściwości fizjologiczne strefowo niezróżnicowanych komórek nadnercza ludzkiego płodu i które wydzielają wszystkie enzymy szlaku steroidogenezy. Można je otrzymać z amerykańskiego zbioru typów kultur (ATCC).

Podłoże do zamrażania używane jest do zamrażania i przechowywania zamrożonych komórek. Podłoże to zawiera podłoże wyjściowe oraz BD NuSerum i sulfotlenek dimetylu.

Zakres liniowy oznacza zakres w ramach krzywej wzorcowej w odniesieniu do systemu do pomiaru hormonów, w którym wyniki są proporcjonalne do stężenia analitu obecnego w próbce.

LOQ oznacza granicę oznaczalności i stanowi najniższą ilość substancji chemicznej, jaką można odróżnić od braku tej substancji (wartość ślepej próby) przy określonej granicy ufności. Do celów omawianej metody granicę oznaczalności zazwyczaj definiuje producent systemów badań, jeżeli nie jest ona określona w inny sposób.

LOEC oznacza najniższe stężenie, przy którym obserwuje się zmiany, czyli najniższe stężenie, przy którym reakcja w teście jest statystycznie różna w porównaniu z kontrolą rozpuszczalnika.

NOEC oznacza najwyższe stężenie, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian, czyli najwyższe badane stężenie, jeżeli test nie daje reakcji dodatniej.

Pasaż oznacza ilość podziałów komórek po inicjacji kultury z zamrożonego zapasu. Wstępnemu pasażowi, który przeprowadzono z zamrożonego zapasu, przypisuje się wartość jeden (1). Komórki, które zostały podzielone jednokrotnie, oznacza się jako pasaż 2 itd.

PBS oznacza roztwór chlorku sodu buforowany fosforanami metodą Dulbecco.

Kontrola jakości, oznaczana skrótem QC, odnosi się do pomiarów niezbędnych do zapewnienia ważności danych.

Płytka kontroli jakości jest płytką 24-dołkową zawierającą dwa stężenia substancji kontroli dodatniej i ujemnej do celów monitorowania efektywności nowej partii komórek lub do celów zapewniania kontroli dodatniej na potrzeby testu podczas badania substancji chemicznych.

Próba jest niezależnym badaniem, w którym wykorzystuje się nowy zestaw roztworów i kontroli.

Podłoże wyjściowe stanowi podstawę do przygotowania innych odczynników. Podłoże to zawiera mieszaninę pożywki Dulbecco's zmodyfikowanego podłoża Eagle'a i podłoża odżywczego Hama F-12 w stosunku 1:1 w 15 mM bufora HEPES, niezawierającego czerwieni fenolowej ani wodorowęglanu sodu. Wodorowęglan sodu dodaje się jako bufor, zob. dodatek II do sprawozdania z walidacji (4).

Podłoże wzbogacone zawiera podłoże wyjściowe oraz BD Nu-Serum i najwyższej jakości mieszaninę ITS+, zob. dodatek II do sprawozdania z walidacji (4).

Steroidogeneza jest syntetycznym szlakiem prowadzącym od cholesterolu do różnych hormonów sterydowych. Niektóre półprodukty na szlaku syntezy sterydów, takie jak progesteron i testosteron, same w sobie są ważnymi hormonami, ale odgrywają również rolę prekursorów dla hormonów powstających na dalszych etapach szlaku syntezy.

T oznacza testosteron, jeden z dwóch najważniejszych androgenów w układach ssaków.

Badana substancja chemiczna oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Płytka do badań jest płytką, na której komórki H295R poddawane są działaniu badanych substancji chemicznych. Płytki do badań zawierają kontrolę rozpuszczalnika i badaną substancję chemiczne w siedmiu poziomach stężenia po trzy płytki dla każdego stężenia.

Trypsyna 1X jest rozcieńczonym roztworem trypsyny, enzymu należącego do proteaz serynowych wytwarzanych przez trzustkę, stosowanym do oddzielania komórek od płytki do hodowli komórek, zob. dodatek III do sprawozdania z walidacji (4).

B.58. BADANIE MUTACJI GENOWEJ KOMÓREK SOMATYCZNYCH I GERMINALNYCH U GRYZONI TRANSGENICZNYCH

WPROWADZENIE

1. Niniejsza metoda badawcza jest zgodna z dotyczącą badań wytyczną OECD nr 488 (2013 r.). W Unii Europejskiej dostępne są metody badawcze dla prowadzenia szerokiego zakresu badań mutacji *in vitro*, za pomocą których można wykryć mutacje chromosomowe lub genowe. Istnieją metody badawcze w odniesieniu do punktów końcowych *in vivo* (tj. aberracja chromosomowa i nieregularna synteza DNA). Za pomocą tych metod nie mierzy się jednak mutacji genowych. Badania mutacji u gryzoni transgenicznych spełniają zapotrzebowanie na praktyczne i powszechnie dostępne badania *in vivo* w kierunku mutacji genowych.

2. Badania mutacji u gryzoni transgenicznych zostały poddane szczegółowej analizie (24)(33). Badania te przeprowadza się na szczurach i myszach transgenicznych, które posiadają wiele kopii zintegrowanych w chromosomie wahadłowych wektorów fagowych lub plazmidowych. Transgeny zawierają geny reporterowe w celu wykrycia różnych rodzajów mutacji wywołanych *in vivo* przez badane substancje chemiczne.

3. Mutacje zachodzące u gryzonia ocenia się punktowo, odzyskując transgen i analizując fenotyp genu reporterowego u gospodarza bakteryjnego bez genu reporterowego. Za pomocą badań mutacji u gryzoni transgenicznych mierzy się mutacje wywołane w genetycznie neutralnych genach pozyskiwanych praktycznie z dowolnej tkanki gryzonia. Dzięki przedmiotowym badaniom pokonuje się zatem wiele istniejących ograniczeń związanych z badaniem mutacji genowej *in vivo* genów endogennych (np. ograniczona liczba tkanek nadających się do analizy, dodatnia/ujemna selekcja względem mutacji).

4. Z wagi dowodów wynika, że transgeny reagują na mutageny podobnie jak geny endogenne, szczególnie jeżeli chodzi o wykrywanie substytucji par zasad, mutacji związanych ze zmianą fazy odczytu, a także niewielkich delecji i insercji (24).

5. W ramach międzynarodowych warsztatów z badań genotoksycznych (International Workshops on Genotoxicity Testing) zatwierdzono włączenie badań mutacji genowych u gryzoni transgenicznych w kierunku wykrycia mutacji genowych *in vivo*, a także zalecono protokół ich wdrożenia (15)(29). Opisywana metoda badawcza opiera się na wyżej wspomnianych zaleceniach. Dalszą analizę uzasadniającą stosowanie protokołu przedstawiono w (16).

6. Oczekuje się, że w przyszłości będzie możliwe łączenie badania mutacji genowych u gryzoni transgenicznych z badaniem toksyczności dawki powtórzonej (rozdział B.7 niniejszego załącznika). Potrzebne są jednak dane, aby mieć pewność, że czułość badania mutacji genowych u gryzoni transgenicznych nie jest zakłócona przez krótszy jednodniowy okres czasu między zakończeniem podawania i czasem pobierania próbek, co ma miejsce w badaniu toksyczności dawki powtórzonej, w porównaniu z 3-dniowym okresem w badaniach mutacji genowych u gryzoni transgenicznych. Niezbędne są również dane wskazujące, że zastosowanie szczepu gryzoni transgenicznych zamiast tradycyjnych szczepów gryzoni nie będzie miało negatywnego wpływu na efektywność badania toksyczności dawki powtórzonej. Przedmiotowa metoda badawcza zastanie zaktualizowania w momencie, w którym dostępne będą wyżej wskazane dane.

7. Definicje kluczowych terminów podano w dodatku.

USTALENIA WSTĘPNE

8. Badania mutacji genowej u gryzoni transgenicznych, w odniesieniu do których dostępne są wystarczające dane na poparcie ich zastosowanie w opisywanej metodzie badawczej, to: myszy z wprowadzonym bakteriofagiem zawierającym gen *lacZ* (Muta™Mouse); mysz z plazmidem zawierającym gen *lacZ*; myszy i szczury *gpt* delta (*gpt* i Spi$^-$); myszy i szczury z wprowadzonym genem *lacI* (Big Blue®), wykonywane w warunkach standardowych. Ponadto do oceny mutacji w modelach Big Blue® i Muta™Mouse można stosować badanie selekcji dodatniej *cII*. Mutagenezę w modelach gryzoni transgenicznych zazwyczaj ocenia się jako częstość występowania mutacji; w razie potrzeby dodatkowe informacje można jednak uzyskać, dokonując analizy molekularnej mutacji (zob. pkt 24).

9. Takie badania mutacji genowej *in vivo* u gryzoni mają szczególne znaczenie w odniesieniu do oceny zagrożenia mutagennego, ponieważ reakcje uzyskane w badaniu zależą od metabolizmu *in vivo*, farmakokinetyki, procesów naprawy DNA, oraz awaryjnego mechanzmu syntezy DNA, chociaż mogą one różnić się od siebie w zależności od gatunku, tkanek oraz rodzajów uszkodzenia DNA. Badanie *in vivo* w kierunku mutacji genowych jest również użyteczne w odniesieniu do dalszych badań skutków mutagennych wykrytych w systemie *in vitro* oraz do dalszych działań w związku z wynikami badań z wykorzystaniem innych punktów końcowych w badaniu *in vivo* (24). Oprócz związku przyczynowego z wywoływaniem nowotworów mutacja genowa stanowi istotny punkt końcowy przy przewidywaniu nienowotworowych chorób powstałych wskutek mutacji w tkankach somatycznych (12)(13) oraz chorób przekazywanych w linii germinalnej.

10. Przeprowadzenie badania mutacji genowej u gryzoni transgenicznych nie jest właściwe, jeżeli istnieją dowody, że badana substancja chemiczna, lub istotny metabolit, nie dotrze do badanych tkanek.

ZASADA BADANIA

11. W badaniach opisanych w pkt 8 gen docelowy jest pochodzenia bakteryjnego lub bakteriofagowego, a odzyskanie z genomowego DNA gryzonia polega na wprowadzeniu transgenu do wahadłowego wektora fagowego lub plazmidowego λ. Procedura obejmuje ekstrakcję genomowego DNA z badanej tkanki gryzonia, przetworzenie *in vitro* genomowego DNA (tj. pakowanie wektorów λ lub ligacja i elektroporacja plazmidów w celu odzyskania wektora wahadłowego), a następnie wykrycie mutacji u gospodarzy bakteryjnych w odpowiednich warunkach. W badaniu stosuje się transgeny neutralne, które łatwo odzyskać z większości tkanek.

12. Podstawowe doświadczenie z zakresu mutacji genowej u gryzoni transgenicznych polega na podawaniu gryzoniowi substancji chemicznej przez określony czas. Substancje chemiczne można podawać każdą odpowiednią drogą, w tym poprzez implantację (np. badanie wyrobów medycznych). Łączny okres podawania dawki zwierzęciu jest zwany okresem podawania. Po podaniu następuje zazwyczaj okres poprzedzający uśmiercenie, podczas którego nie podaje się substancji chemicznej, a nienaprawione uszkodzenia DNA zostają utrwalone w postaci stabilnych mutacji. W literaturze okres ten występuje pod różnymi nazwami, tj. czasu manifestacji, czasu utrwalenia lub czasu ekspresji; okres ten kończy się pobraniem próbek (15)(29). Po uśmierceniu zwierzęcia genomowe DNA zostaje wyizolowane z badanej tkanki lub tkanek i oczyszczone.

13. Dane dotyczące pojedynczej tkanki każdego zwierzęcia z wielu pakietów/ligacji są zazwyczaj zagregowane, a częstość występowania mutacji zazwyczaj ocenia się, stosując łącznie 10^5–10^8 jednostek tworzących łysinki lub jednostek tworzących kolonię. Stosując metodę selekcji dodatniej, całkowitą liczbę jednostek tworzących łysinki określa się za pomocą oddzielnego zestawu płytek z podłożem nieselektywnym.

14. Opracowano metody selekcji dodatniej, aby ułatwić wykrywanie mutacji zarówno w genie *gpt* [mysz i szczur *gpt* delta, fenotyp *gpt*$^-$ (20)(22)(28)], jak i genie *lacZ* [Muta™Mouse lub mysz z plazmidem zawierającym gen *lacZ* (3)(10)(11)(30)]. Natomiast mutacje genu *lacI* u zwierząt Big Blue® są wykrywane metodą nieselektywną, za pomocą której mutacje identyfikuje się dzięki tworzeniu zabarwionych (na niebiesko) łysinek. Metodę selekcji dodatniej stosuje się również do wykrywania mutacji punktowych powstających w genie *cII* wahadłowego wektora bakteriofaga λ [mysz lub szczur Big Blue® oraz Muta™Mouse (17)] oraz delecji w genach λ *red* i *gam* [selekcja Spi$^-$ u myszy i szczura *gpt* delta (21)(22)(28)]. Częstość występowania mutacji oblicza się, dzieląc liczbę łysinek/plazmidów zawierających mutacje w transgenie przez całkowitą liczbę łysinek/plazmidów uzyskanych z tej samej próbki DNA. W badaniach mutacji genowej u gryzoni transgenicznych zgłaszanym parametrem jest częstość występowania mutacji. Ponadto częstość występowania mutacji można określać jako frakcję komórek, w których zachodzą niezależne mutacje. Wykonanie tego obliczenia wymaga korekty o ekspansję klonalną w drodze sekwencjonowania pod kątem uzyskanych mutacji (24).

15. Mutacje zliczane w badaniach mutacji punktowej genów *lacI, lacZ, cII* i *gpt* obejmują głównie substytucje par zasad, mutacje spowodowane zmianami fazy odczytu oraz niewielkie insercje/delecje. Względny udział tych rodzajów mutacji wśród mutacji spontanicznych przypomina mutacje obserwowane w przypadku genu endogennego *Hprt*. Duże delecje wykrywa się wyłącznie stosując selekcję Spi$^-$ oraz badanie przy użyciu plazmidów zawierających gen *lacZ* (24). Badanymi mutacjami są mutacje *in vivo* powstające u myszy lub szczura. Mutacje w badaniach *in vitro* i *ex vivo,* które mogą powstawać podczas uzyskiwania fagów/plazmidów, replikacji lub naprawy, występują stosunkowo rzadko, a w niektórych systemach można je wyraźnie zidentyfikować lub wykluczyć za pomocą systemu gospodarza bakteryjnego/selekcji dodatniej.

OPIS METODY BADAWCZEJ

Przygotowania

Wybór gatunków zwierząt

16. Obecnie dostępne są liczne modele wykrywania mutacji genowej u myszy transgenicznych, które to systemy są powszechniej stosowane niż modele szczurów transgenicznych. Jeżeli szczur jest zdecydowanie bardziej odpowiednim modelem niż mysz (np. w badaniu mechanizmu karcynogenezy dla guzów obserwowanych jedynie u szczurów; do celów korelacji z badaniem toksyczności u szczurów; lub jeżeli wiadomo, że metabolizm u szczurów jest bardziej reprezentatywny dla metabolizmu u ludzi), należy rozważyć wykorzystanie modeli szczurów transgenicznych.

Warunki trzymania i żywienia

17. Temperatura w pomieszczeniu ze zwierzętami doświadczalnymi powinna wynosić 22 °C (± 3 °C). Chociaż wilgotność względna powinna wynosić co najmniej 30 % i pożądane jest, żeby nie przekraczała 70 % poza czasem czyszczenia pomieszczenia, celem powinno być utrzymywanie jej na poziomie 50–60 %. Oświetlenie powinno być sztuczne, w cyklu dziennym 12 godzin światła, 12 godzin ciemności. Do żywienia można stosować konwencjonalne pasze laboratoryjne z nieograniczonym dostępem do wody pitnej. Wybór paszy może zależeć od potrzeby zapewnienia odpowiedniej domieszki badanej substancji chemicznej przy podawaniu jej tą drogą. Zwierzęta należy trzymać w małych grupach (nie więcej niż pięć zwierząt) tej samej płci, jeżeli nie oczekuje się agresywnego zachowania. Jeżeli ma to naukowe uzasadnienie, zwierzęta mogą być trzymane oddzielnie.

Przygotowanie zwierząt

18. Zdrowe, młode, dojrzałe płciowo dorosłe zwierzęta (w wieku 8–12 tygodni na początku badania) są losowo przydzielane do grup kontrolnych i badanych. Zwierzęta są identyfikowane jednoznacznie. Zwierzęta są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych co najmniej przez pięć dni. Klatki powinny być ustawione w taki sposób, żeby zminimalizować możliwy wpływ położenia klatki. W momencie rozpoczęcia badania różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne oraz nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy dla każdej płci.

Przygotowanie dawek

19. Stałe badane substancje chemiczne powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach lub domieszane do paszy lub wody pitnej przed podaniem dawki zwierzętom. Płynne badane substancje chemiczne mogą być dawkowane bezpośrednio lub mogą zostać rozcieńczone przed dawkowaniem. W przypadku inhalacji badane substancje chemiczne można podawać w postaci gazu, pary lub stałych/ciekłych aerozoli, w zależności od ich właściwości fizyczno-chemicznych. Powinny zostać wykorzystane świeże preparaty badanej substancji chemicznej, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Warunki badawcze

Rozpuszczalnik/nośnik

20. Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać skutków toksycznych przy wykorzystywanych objętościach dawki oraz nie powinien reagować chemicznie z badaną substancją chemiczną. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do badania powinno być poparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

Kontrole dodatnie

21. Na ogół należy prowadzić równoległą grupę zwierząt na potrzeby kontrolni dodatniej. W przypadku laboratoriów, które wykazały kompetencje (zob. pkt 23) i które regularnie wykonują przedmiotowe badania, do każdego badania można jednak włączyć DNA zwierząt stanowiących wcześniejszą kontrolę dodatnią, aby potwierdzić sukces metody. Takie DNA pochodzące z wcześniejszych doświadczeń należy uzyskać od tego samego gatunku oraz z tej samej badanej tkanki i odpowiednio przechowywać (zob. pkt 36). Prowadząc równoległą kontrolę dodatnią, nie trzeba stosować tej samej drogi podawania, co w przypadku grupy badanej substancji chemicznej. Musi być jednak wiadomo, że kontrole dodatnie wywołują mutacje w co najmniej jednej badanej tkance w odniesieniu do grupy badanej substancji chemicznej. Dawki substancji chemicznych na potrzeby kontroli dodatnich należy dobierać tak, aby dawały słabe lub umiarkowane efekty, które umożliwiają krytyczną ocenę efektywności i czułości badania. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe substancje stosowane do kontroli dodatnich i niektóre ich tkanki docelowe.

Tabela 1

Przykładowe substancje na potrzeby kontroli dodatnich i niektóre ich tkanki docelowe

Substancje chemiczne na potrzeby kontroli dodatnich i nr CAS	Nazwa EINECS i nr EINECS	Właściwości	Docelowa tkanka, w której ma dojść do mutacji	
			Szczur	Mysz
N-etylo-N-nitrozomocznik [Nr CAS 759-73-9]	N-etylo-N-nitrozomocznik [212-072-2]	Mutagen o działaniu bezpośrednim	Wątroba, płuco	Szpik kostny, okrężnica, nabłonek okrężnicy, jelito, wątroba, płuco, śledziona, nerka, komórki ziarniste jajników, męskie komórki germinalne

Substancje chemiczne na potrzeby kontroli dodatnich i nr CAS	Nazwa EINECS i nr EINECS	Właściwości	Docelowa tkanka, w której ma dojść do mutacji	
			Szczur	Mysz
Karbaminian etylu (uretan) [Nr CAS 51-79-6]	Uretan [200-123-1]	Mutagen, wymaga metabolizmu, jednak daje jedynie słabe efekty		Szpik kostny, przedżołądek, jelito cienkie, wątroba, płuco, śledziona
2,4-diaminotoluen [nr CAS 95-80-7]	4-metylo-m-fenylenodiamina [202-453-1]	Mutagen, wymaga metabolizmu, dodatni również w badaniu Spi^-	Wątroba	Wątroba
Benzo[a]piren [nr CAS 50-32-8]	Benzo[def]chryzen [200-028-5]	Mutagen, wymaga metabolizmu	Wątroba, sieć	Szpik kostny, pierś, okrężnica, przedżołądek, żołądek gruczołowy, serce, wątroba, płuco, męskie komórki germinalne

Kontrole ujemne

22. Ujemne kontrole, poddane działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a poza tym traktowane w ten sam sposób co grupy poddane działaniu substancji, powinny zostać uwzględnione w każdym pobieraniu próbek. Jeżeli nie istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych szkodliwych lub mutagennych skutków, grupy kontrolne niepoddane działaniu substancji powinny zostać również uwzględnione w każdym okresie pobierania próbek w celu ustalenia dopuszczalności grupy kontrolnej nośnika.

Weryfikacja biegłości laboratorium

23. Kompetencje w zakresie przedmiotowych badań ustala się, wykazując zdolność do odtworzenia oczekiwanych wyników z opublikowanych danych (24) dla: 1) częstości występowania mutacji przy zastosowaniu substancji chemicznych jako kontroli dodatnich (w tym reakcje słabe), takich jak te wymienione w tabeli 1, substancji innych niż mutageny oraz grup kontrolnych nośnika; oraz 2) odzyskania transgenu z genomowego DNA (np. wydajność pakowania).

Sekwencjonowanie mutacji

24. W przypadku zastosowań normatywnych sekwencjonowanie DNA mutacji nie jest wymagane, szczególnie w przypadku uzyskania wyraźnego wyniku dodatniego lub ujemnego. Dane sekwencjonowania mogą jednak być przydatne, jeżeli odnotowuje się duże zróżnicowanie indywidualne. W takich przypadkach można zastosować sekwencjonowanie w celu wykluczenia możliwości wystąpienia kumulacji (ang. jackpots) lub klonowania poprzez identyfikację odsetka unikalnych mutacji w określonej tkance. Sekwencjonowanie około 10 mutacji na tkankę na zwierzę powinno wystarczyć do prostego określenia, czy mutacje klonalne wpływają na częstość występowania mutacji. Wysekwencjonowanie aż 25 mutacji może być niezbędne do dokonania matematycznej korekty częstości występowania mutacji pod kątem klonalności. Sekwencjonowania mutacji można również rozważyć w przypadku wykrycia niewielkich wzrostów częstości występowania mutacji (tj. wartości nieco przewyższających wartości uzyskane w grupie kontrolnej niepoddanej działaniu substancji). Różnice w spektrum mutacji między hodowlami zmutowanych komórek zwierząt poddanych działaniu substancji i zwierząt niepoddanych działaniu substancji mogą potwierdzać skutki mutagenne (29). Ponadto spektra mutacji mogą być przydatne przy formułowaniu hipotez mechanistycznych. Jeżeli sekwencjonowanie ma zostać uwzględnione w protokole badania, należy zachować szczególną uwagę przy tworzeniu projektu takich badań, w szczególności w odniesieniu do liczby zmutowanych komórek podczas sekwencjonowania jednej próbki, aby uzyskać odpowiednią moc zgodnie z zastosowanym modelem statystycznym (zob. pkt 43).

PROCEDURA

Liczba i płeć zwierząt

25. Należy wcześniej ustalić całkowitą liczbę zwierząt w grupie tak, aby była wystarczająca do uzyskania statystycznej mocy testu niezbędnej do wykrycia co najmniej podwojenia częstości występowania mutacji. Grupa powinna składać się z co najmniej pięciu zwierząt. Jeżeli jednak moc testu jest niewystarczająca, należy odpowiednio zwiększyć liczbę zwierząt. Zasadniczo należy wykorzystywać samce zwierząt. Może zdarzyć się, że badania samych samic byłoby uzasadnione, przykładowo w przypadku testowania leków dla ludzi przeznaczonych dla kobiet lub badania metabolizmu kobiet. Jeżeli zachodzą znaczne różnice między płciami pod względem toksyczności lub metabolizmu, należy wykorzystać zarówno samce, jak i samice.

Okres podawania

26. Na podstawie obserwacji, zgodnie z którymi z każdym poddawaniem działaniu substancji zachodzi akumulacja mutacji, niezbędny jest schemat powtarzanego dawkowania, obejmujący podawanie substancji badanej codziennie przez okres 28 dni. Powszechnie uznaje się to za dopuszczalne zarówno pod względem uzyskania wystarczającej akumulacji mutacji wywołanych słabymi mutagenami, jak i pod względem uzyskania czasu ekspozycji odpowiedniego do wykrycia mutacji w narządach, których proliferacja tkanek zachodzi powoli. W przypadku niektórych ocen odpowiednie może być zastosowanie alternatywnych schematów podawania substancji, które należy naukowo uzasadnić w protokole. Poddawanie działaniu substancji nie powinno trwać krócej niż czas wymagany do całkowitego indukowania wszystkich odpowiednich enzymów metabolicznych. Poddawanie działaniu substancji przez krótszy czas może wymagać zastosowania wielokrotnego pobierania próbek, odpowiedniego dla narządów o różnym tempie proliferacji tkanek. W każdym przypadku, uzasadniając protokół, należy przestawić wszystkie dostępne informacje (np. dotyczące toksyczności ogólnej lub metabolizmu i farmakokinetyki), szczególnie w przypadku odejścia od powyższych standardowych zaleceń. Czas poddawania działaniu substancji dłuższy niż 8 tygodni należy dokładnie wyjaśnić i uzasadnić, ponieważ może to również powodować wyraźny wzrost częstości występowania mutacji w drodze ekspansji klonalnej (29), chociaż może zwiększyć czułość badania.

Poziomy dawek

27. Poziomy dawek powinny opierać się na wynikach badania służącego wyznaczeniu zakresów dawki, w ramach którego dokonuje się pomiaru ogólnej toksyczności, przeprowadzonego tą samą drogą ekspozycji, lub na wynikach wcześniej istniejących badań toksyczności podostrej. Do wyznaczenia zakresów dawki można wykorzystać zwierzęta nietransgeniczne należące do tego samego szczepu gryzoni. W ramach głównego badania, w celu uzyskania informacji dotyczących zależności dawka-odpowiedź, całkowite badanie powinno obejmować kontrolę ujemną (zob. pkt 22) i co najmniej trzy poziomy dawek podawanych w odpowiednich odstępach, z wyjątkiem przypadków zastosowania dawki granicznej (zob. pkt 28). Najwyższą dawką powinna być najwyższa tolerowana dawka. Najwyższa tolerowana dawka jest określona jako dawka wywołująca oznaki toksyczności, przy czym oczekuje się, że wyższe poziomy dawek oparte na tym samym schemacie dawkowania mogłyby być śmiertelne. Substancje chemiczne o szczególnej aktywności biologicznej przy niskich nietoksycznych dawkach (takie jak hormony i mitogeny) oraz substancje chemiczne wykazujące intensywne właściwości toksykologiczne mogą stanowić wyjątek w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane odrębnie dla każdego przypadku. Poziomy dawek powinny objąć zakres od maksymalnej do niskiej toksyczności lub do jej braku.

Badanie graniczne

28. Jeżeli badania służące wyznaczeniu zakresów dawki lub istniejące dane dotyczące pokrewnych szczepów gryzoni wskazują, że schemat dawkowania dla co najmniej dawki granicznej (zob. poniżej) nie daje obserwowalnych efektów toksycznych oraz jeżeli nie podejrzewa się genotoksyczności w oparciu o dane dotyczące substancji chemicznych powiązanych strukturalnie, wówczas przeprowadzenie pełnego badania z zastosowaniem trzech poziomów dawek może nie być konieczne. W przypadku okresu podawania wynoszącego 28 dni (tj. 28 dni poddawania działaniu substancji) dawka graniczna wynosi 1 000 mg/kg masy ciała/dobę. W przypadku okresów podawania wynoszących nie więcej niż 14 dni, dawka graniczna wynosi 2 000 mg/kg masy ciała/dobę (schematy dawkowania inne niż 28 dni poddawania działaniu substancji należy naukowo uzasadnić w protokole; zob. pkt 26).

Podawanie dawek

29. Badana substancja chemiczna jest zazwyczaj podawana przez sondę przy użyciu sondy żołądkowej lub odpowiedniej kaniuli intubacyjnej. Zasadniczo, opracowując badanie, należy rozważyć przewidywaną drogę narażenia ludzi. Dlatego też możliwe jest dopuszczenie innych dróg narażenia (takich jak podawanie w wodzie pitnej, podawanie podskórne, dożylne, miejscowe, inhalacja, podawanie dotrztchawiczne, podawanie w paszy lub implantacja), jeżeli można to uzasadnić. Nie zaleca się stosowania wstrzyknięcia dootrzewnowego, ponieważ z fizjologicznego punktu widzenia nie jest to droga narażenia ludzi. Maksymalna objętość płynu, jaka może być podana przez sondę lub wstrzyknięta jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 2 ml/100 g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż podane musi być uzasadnione. Poza drażniącymi i żrącymi substancjami chemicznymi, które zwykle dają zaostrzone objawy przy wyższych stężeniach, zmienność objętości w badaniu powinna być zminimalizowana przez dostosowanie stężenia, aby zapewnić stałą objętość przy wszystkich poziomach dawki.

Czas pobierania próbek

Komórki somatyczne

30. Czas pobierania próbek stanowi kluczową zmienną, ponieważ ustala się go na podstawie okresu potrzebnego do utrwalenia mutacji. Okres ten zależy od tkanki i wydaje się związany z czasem odnowy populacji komórek, przy czym szpik kostny i jelito reagują szybko, a wątroba znacznie wolniej. Odpowiedni kompromis w odniesieniu do pomiaru częstości występowania mutacji zarówno w tkankach o szybkiej proliferacji, jak i w tkankach o wolnej proliferacji to 28 kolejnych dni poddawania działaniu substancji (jak wskazano w pkt 26) oraz pobieranie próbek

w trzy dni po ostatnim podaniu, chociaż w tych warunkach może nie dojść do maksymalnej częstości występowania mutacji w tkankach o wolnej proliferacji. Jeżeli tkanki o wolnej proliferacji mają szczególne znaczenie, odpowiedniejsze może być zastosowanie późniejszego czasu pobierania próbek wynoszącego 28 dni po okresie podawania wynoszącym 28 dni (16)(29). W takich przypadkach zamiast czasu pobierania próbek w 3 dniu po okresie podawania zastosowano by późniejszy czas pobierania próbek, który wymagałby naukowego uzasadnienia.

Komórki germinalne

31. Testy na gryzoniach transgenicznych są odpowiednie do badania indukcji mutacji genowej w męskich komórkach germinalnych (7)(8)(27), w przypadku których wyraźnie określono czas i kinetykę spermatogenezy (27). Mała liczba komórek jajowych dostępnych do analizy, nawet po superowulacji, oraz brak syntezy DNA w oocycie wykluczają określenie mutacji w żeńskich komórkach germinalnych z zastosowaniem badań na zwierzętach transgenicznych (31).

32. Wyboru momentów pobierania próbek dla męskich komórek germinalnych dokonuje się w taki sposób, aby pobrać próbki szeregu rodzajów komórek poddanych narażeniu w całym procesie rozwoju komórki germinalnej oraz tak, aby na docelowym etapie pobierania próbek narażenie było wystarczające. Czas potrzebny na rozwój komórek germinalnych ze spermatogoniów do postaci dojrzałych plemników docierających do nasieniowodu/ogonów najądrzy wynosi ~ 49 dni dla myszy (36) oraz ~ 70 dni dla szczurów (34)(35). Po 28-dniowym okresie narażenia, a następnie 3-dniowym okresie pobierania próbek zakumulowane plemniki pobrane z nasieniowodu/ogonów najądrzy (7)(8) stanowią populację komórek poddanych narażeniu w przybliżeniu w drugiej połowie spermatogenezy, w tym na etapie mejotycznym i postmejotycznym, lecz nie na etapie spermatogonium lub komórki macierzystej. Aby w odpowiedni sposób pobrać próbki komórek znajdujących się w nasieniowodzie/ogonach najądrzy, które w okresie narażenia były spermatogoniami, należy dodatkowo pobrać próbki po upływie co najmniej 7 tygodni (myszy) lub 10 tygodni (szczury) od zakończenia poddawania działaniu substancji.

33. Komórki uzyskane z cewek nasiennych po okresie 28 + 3 dni stanowią populację mieszaną, obejmującą wszystkie etapy rozwoju komórek germinalnych (7)(8). Pobieranie próbek tych komórek w celu wykrycia mutacji genowych nie zapewnia tak dokładnej oceny etapów, na których doszło do indukowania mutacji komórek germinalnych, jaką można uzyskać, pobierając próbki plemników z nasieniowodu/ogonów najądrzy (ponieważ próbki pobierane z cewek zawierają szereg rodzajów komórek germinalnych i dochodzi do skażenia przedmiotowej populacji komórek niektórymi komórkami somatycznymi). Pobranie próbek komórek z cewek nasiennych oprócz pobrania próbek plemników z nasieniowodu/ogonów najądrzy zgodnie ze schematem pobierania próbek 28 + 3 dni zagwarantowałoby jednak, że w skład pobranych komórek wchodziłyby komórki poddane narażeniu na większości etapów rozwoju komórki germinalnej, co może być przydane do wykrywania mutagenów komórek germinalnych.

Obserwacje

34. Ogólne obserwacje kliniczne powinny być przeprowadzane co najmniej raz dziennie, najlepiej każdego dnia o tej samej porze, biorąc pod uwagę szczytowy okres przewidywanych objawów po dawkowaniu. Stan zdrowia zwierząt powinien być odnotowywany. Co najmniej dwa razy dziennie wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane pod kątem zachorowalności i śmiertelności. Wszystkie zwierzęta powinny być ważone co najmniej raz w tygodniu oraz przed uśmierceniem. Pomiary spożycia paszy powinny być dokonywane przynajmniej co tydzień. Jeżeli badana substancja chemiczna jest podawana w wodzie pitnej, spożycie wody musi być także mierzone przy każdej zmianie wody i przynajmniej cotygodniowo. Zwierzęta wykazujące oznaki nadmiernej toksyczności nieprowadzące do śmierci należy poddać eutanazji przed zakończeniem badania (23).

Pobieranie tkanek

35. Należy wyraźnie określić podstawy pobrania tkanek. Ponieważ praktycznie każdą tkankę można poddać badaniu pod kątek indukowania mutacji, wybór tkanek, które zostaną pobrane, powinien być uwarunkowany przyczyną przeprowadzania badania oraz wszelkimi istniejącymi danymi dotyczących badanej substancji chemicznej w zakresie mutagenności, rakotwórczości lub toksyczności. Do istotnych czynników, które należy rozważyć, należy drogę podania (w oparciu o prawdopodobną drogę lub drogi narażenia ludzi), przewidywana dystrybucja w tkankach oraz ewentualny mechanizm działania. W przypadku braku informacji ogólnych należy pobrać szereg tkanek somatycznych, które przypuszczalnie są istotne. Tkanki te powinny obejmować tkanki szybko proliferujące, tkanki wolno proliferujące i tkanki w miejscu kontaktu. Ponadto należy pobrać i przechowywać plemniki z nasieniowodu/ogonów najądrzy oraz rozwijające się komórki germinalne z cewek nasiennych (zgodnie z opisem zawartym w pkt 32 i 33) na wypadek konieczności przeprowadzenia w przyszłości analizy mutagenności komórek germinalnych. Należy uzyskać masy narządów, a w przypadku dużych narządów od wszystkich zwierząt należy je pobrać ten sam obszar.

Przechowywanie tkanek i DNA

36. Tkanki (lub homogenaty tkanek) należy przechowywać w temperaturze –70 °C lub niższej i wykorzystać w celu izolacji DNA w ciągu 5 lat. Wyizolowane DNA przechowywane schłodzone w temperaturze 4 °C we właściwym buforze należy najlepiej wykorzystać do analizy mutacji w przeciągu 1 roku.

Wybór tkanek do analizy mutacji

37. Wyboru tkanek należy dokonywać, uwzględniając takie kwestie jak: 1) droga podania lub miejsce pierwszego kontaktu (np. żołądek gruczołowy przy podaniu drogą pokarmową, płuco przy podaniu przez inhalację lub skóra przy podaniu miejscowym); oraz 2) parametry farmakokinetyczne odnotowane w ogólnych badaniach toksyczności, wskazujące rozmieszczenie, zatrzymanie lub akumulację w tkankach, lub narządy docelowe pod kątem toksyczności. W przypadku prowadzenia badań uzupełniających badania rakotwórczości należy rozważyć docelowe tkanki pod kątem rakotwórczości. Tkanki do analizy należy tak dobierać, aby zmaksymalizować wykrycie substancji chemicznych będących mutagenami działającymi bezpośrednio w badaniu *in vitro*, charakteryzujących się szybkim metabolizmem, dużą reaktywnością i słabą absorpcją, lub substancji chemicznych, w odniesieniu do których tkankę docelową określa się na podstawie drogi podania (6).

38. W przypadku braku informacji ogólnych i uwzględniając miejsce kontaktu wynikające z drogi podania, ocenie w kierunku mutagenności należy poddać wątrobę i co najmniej jedną tkankę ulegającą szybkiemu podziałowi (np. żołądek gruczołowy, szpik kostny). W większości przypadków powyższe wymogi można spełnić, przeprowadzając analizę dwóch starannie dobranych tkanek, jednak w niektórych przypadkach konieczne byłoby zastosowanie co najmniej trzech tkanek. Jeżeli istnieją powody szczególnych obaw w odniesieniu do skutków dla komórek germinalnych, w tym dodatnich wyników w komórkach somatycznych, należy zbadać tkanki zawierające komórki germinalne pod kątem mutacji.

Metody pomiaru

39. Dostępne są standardowe metody laboratoryjne lub opublikowane metody wykrywania mutacji dla zalecanych modeli transgenicznych: bakteriofag lambda i plazmid zawierające gen *lacZ* (30); mysz z wprowadzonym genem *lacI* (2)(18); mysz *gpt* delta (22); szczur *gpt* delta (28); *cII* (17). Zmiany należy uzasadnić i odpowiednio udokumentować. Dane dotyczące wielu reakcji pakowania można zagregować i wykorzystać do osiągnięcia odpowiedniej liczby łysinek lub kolonii. Konieczność zastosowania dużej liczby reakcji pakowania w celu osiągnięcia odpowiedniej liczby łysinek może jednak wskazywać na niską jakość DNA. W takich przypadkach, rozważając dane, należy zachować ostrożność, ponieważ mogą być one niewiarygodne. Optymalna całkowita liczba łysinek lub kolonii przypadająca na próbkę DNA zależy od statystycznego prawdopodobieństwa wykrycia wystarczającej liczby mutacji przy danej częstości występowania mutacji spontanicznych. Zasadniczo przy częstości występowania mutacji spontanicznych rzędu 3×10^{-5} minimalna wymagana liczba łysinek wynosi 125 000–300 000 (15). W przypadku badania Big Blue® *lacI* ważne jest, aby wykazać, że cały zakres zabarwionych fenotypów mutacji można wykryć, wprowadzając odpowiednie kontrole barwienia równolegle do każdego testu płytkowego. Tkanki i ich próbki (pozycje) należy przetworzyć i przeanalizować, stosując projekt blokowy, w którym pozycje z grupy kontrolnej nośnika/rozpuszczalnika, grupy kontroli dodatniej (jeżeli ją zastosowano) lub kontroli dodatniej DNA (w stosownych przypadkach) oraz wszystkich grup poddanych działaniu substancji są przetwarzane łącznie.

DANE I SPRAWOZDAWCZOŚĆ

Opracowanie wyników

40. Dane dotyczące poszczególnych zwierząt powinny zostać przedstawione w formie tabelarycznej. Jednostką doświadczalną jest zwierzę. W sprawozdaniu należy uwzględnić łączną liczbę jednostek tworzących łysinki (pfu) lub jednostek tworzących kolonię (cfu), liczbę mutacji i częstość występowania mutacji w odniesieniu do każdej tkanki każdego zwierzęcia. Jeżeli istnieje wiele reakcji pakowania/izolacji, należy odnotować liczbę reakcji przypadającą na próbkę DNA. Chociaż należy zachować dane dotyczące poszczególnych reakcji, odnotować należy jedynie łączną liczbę pfu lub cfu. Należy zgłosić dane dotyczące toksyczności i objawów klinicznych, jak wskazano w pkt 34. Wszelkie wyniki sekwencjonowania należy przedstawiać dla każdej przeanalizowanej mutacji i należy przedstawić wynikłe obliczenia częstości występowania mutacji dla każdego zwierzęcia i dla każdej tkanki.

Ocena statystyczna i interpretacja wyników

41. Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników dodatnich, takie jak związany z dawką wzrost częstości występowania mutacji lub wyraźny wzrost częstości występowania mutacji w grupie pojedynczej dawki w porównaniu do grupy kontrolnej rozpuszczalnika/nośnika. Aby uzyskać wystarczające dane do analizy zależności dawka-odpowiedź, należy przeanalizować co najmniej trzy poddane działaniu substancji grupy dawkowania. Chociaż biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności, można wykorzystać odpowiednie metody statystyczne jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (4)(14)(15)(25)(26). Jednostką doświadczalną w zastosowanych badaniach statystycznych powinno być zwierzę.

42. Badana substancja chemiczna, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w opisywanym badaniu. W przypadku biologicznego znaczenia wyników ujemnych należy potwierdzić narażenie tkanki.

43. W przypadku analiz sekwencjonowania DNA dostępnych jest wiele metod statystycznych jako metod pomocniczych w interpretacji wyników (1)(5)(9)(19).

44. Uwzględnienie, czy zaobserwowane wartości są w obrębie historycznych zakresów kontroli, czy też poza nimi, może stanowić wskazówkę przy ocenie biologicznego znaczenia reakcji (32).

Sprawozdanie z badania

45. Sprawozdanie z badania powinno zawierać następujące informacje:

Badana substancja chemiczna:

— dane identyfikacyjne i numer CAS, jeżeli jest znany,

— źródło, numer partii, jeżeli jest dostępny,

— cechy fizyczne i czystość,

— właściwości fizyko-chemiczne stosownie do warunków przeprowadzania badania,

— stabilność badanej substancji chemicznej, jeżeli jest znana.

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność badanej substancji chemicznej w rozpuszczalniku/nośniku,

— przygotowanie postaci użytkowych paszy, wody pitnej i inhalacji,

— analityczne określenie postaci użytkowych (np. stabilność, homogeniczność, stężenia nominalne).

Badane zwierzęta:

— wykorzystany gatunek/szczep oraz uzasadnienie ich wyboru,

— liczba, wiek i płeć zwierząt,

— źródło, warunki przebywania, pasza itp.,

— masa poszczególnych zwierzęcia na początku badania, łącznie z zakresem mas ciała, średnimi oraz standardowymi odchyleniami dla każdej grupy.

Warunki badania:

— dane dotyczące dodatnich i ujemnych (rozpuszczalnik/nośnik) kontroli,

— dane z badania ustalania zakresu,

— uzasadnienie w odniesieniu do wyboru poziomu dawki,

— szczegóły dotyczące preparatów badanej substancji chemicznej,

— szczegóły dotyczące podawania badanej substancji chemicznej,

— racjonalne uzasadnienie w odniesieniu do drogi podawania,

— metody pomiaru toksyczności u zwierząt, w tym dostępne badania histopatologiczne lub hematologiczne oraz częstotliwość przeprowadzania obserwacji zwierząt i pomiaru masy ciała,

— metody sprawdzania, czy badana substancja chemiczna dotarła do tkanki docelowej lub do krwiobiegu w przypadku otrzymania wyników ujemnych,

— dawka faktyczna (mg/kg masy ciała/dzień) obliczona w oparciu o stężenie badanej substancji chemicznej w paszy/wodzie pitnej (ppm) i spożycia, w stosownych przypadkach,

— szczegóły dotyczące jakości pożywienia i wody,

— szczegółowy opis harmonogramów poddawania działaniu substancji oraz pobierania próbek,

— metody eutanazji,

— procedury izolowania i konserwacji tkanek,

— metody izolacji genomowego DNA gryzoni, odzyskanie transgenu z genomowego DNA oraz przenoszenia transgenicznego DNA do gospodarza bakteryjnego,

— źródło i numery partii wszystkich komórek, zestawów i odczynników (w stosownych przypadkach),

— metody oznaczania liczby mutacji,

— metody molekularnej analizy mutacji i zastosowanie ich przy dokonywaniu korekcji o klonalność lub obliczaniu częstości występowania mutacji, w stosownych przypadkach.

Wyniki:

— stan zwierząt przed badaniem i podczas całego okresu badania, w tym oznaki toksyczności,

— masa ciała i narządów w chwili uśmiercenia,

— w odniesieniu do każdej tkanki/każdego zwierzęcia liczba badanych mutacji, liczba łysinek lub kolonii, częstotliwość występowania mutacji,

— dla każdej grupy tkanek/zwierząt, liczba reakcji pakowania dla próbki DNA, łączna liczba mutacji, średnia częstość występowania mutacji, odchylenie standardowe,

— zależność dawka-odpowiedź, w miarę możliwości,

— w odniesieniu do każdej tkanki/każdego zwierzęcia liczba niezależnych mutacji i średnia częstość występowania mutacji w przypadku przeprowadzenia molekularnej analizy mutacji,

— dane dotyczące równolegle prowadzonej i historycznej kontroli ujemnej z uwzględnieniem zakresów, średnich i odchyleń standardowych,

— dane dotyczące jednoczesnej kontroli dodatniej (lub niejednoczesnych kontroli dodatnich DNA),

— oznaczenia analityczne, jeżeli jest dostępne (np. stężenia DNA zastosowane w pakowaniu, dane z sekwencjonowania DNA),

— zastosowane analizy i metody statystyczne.

Omówienie wyników

Wnioski

LITERATURA

(1) *Adams,* W.T. i T.R. *Skopek* (1987 r.), »Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra«, *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002 r.), »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 i J. Vijg (1995 r.), »Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations«, *Nature*, 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. i N.J. Gorelick (1995 r.), »Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice«, *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. i N.J. Gorelick (1996 r.), »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 i V. Thybaud (1999 r.), »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 i L.M. Soper(1995 r.), »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 i J. Jiao (1997 r.), »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. i K.R. Tindall (2000 r.), »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 id J. Vijg(1989 r.), »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. i J. Vijg (1993 r.), »A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host«, *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003 r.), »Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer«, *Mutation Res.*, 543: 125–136.

(13) Erikson, R.P. (2010 r.), »Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update«, *Mutation Res.*, 705: 96–106.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas i D. Krewski (1998 r.), »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 i N. Yajima (2000 r.), »In vivo Transgenic Mutation Assays«, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus i G.R. Douglas (2003 r.), »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 i S. Garges (1996 r.), »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 i J.M. Short (1990 r.), »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 id P.A. Burns (2008 r.), »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 i T. Sofuni (1996 r.), »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 i T. Sofuni (1999 r.), »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 i K.I. Masumura (2000 r.), »Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays«, *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OECD (2000 r.), 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, No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paryż.

(24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, No 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paryż.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant i K.R. Tindall (1995 r.), »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 i N.J. Gorelick (1997 r.), »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 i C.L. Yauk (2006 r.), »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 i T. Nohmi (2010 r.), »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 i N. Yajima (2003 r.), »*In vivo* Transgenic Mutation Assays«, *Mutation Res.*, 540: 141–151.

(30) Vijg, J. i G.R. Douglas (1996 r.), »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, s. 391–410.

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster i G.R. Douglas (2005 r.), »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 r.), »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, No 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paryż.

(34) Clermont, Y. (1972 r.), »Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal«. Physiol. Rev. 52: 198–236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., i Oregbin-Crist, M.-C. (2006), »The Epididymis«, w Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., i P. M, Wassarman (red.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, s. 1071–1148.

(36) Russell, L.B. (2004 r.), »Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse«, Genetica, 122: 25–36.

Dodatek

DEFINICJE:

Okres podawania: całkowity okres podawania dawek zwierzęciu.

Substytucja par zasad: mutacja powodująca podstawienie pojedynczej zasady azotowej nukleotydów DNA przez inną zasadę azotową nukleotydów DNA.

Kapsyd: płaszcz białkowy otaczający wirion.

Substancja chemiczna: substancja lub mieszanina.

Ekspansja klonalna: tworzenie wielu komórek z pojedynczej (zmutowanej) komórki.

Jednostka tworząca kolonię (cfu): miara liczby żywotnych bakterii.

Konkatamer: długa, ciągła biomolekuła zbudowana z wielu jednakowych odcinków połączonych ze sobą na zasadzie *głowa-ogon*.

Region cos: 12-nukleotydowy odcinek jednoniciowego DNA położony na obu końcach dwuniciowego genomu bakteriofagu lambda.

Delecja: mutacja powodująca utratę jednego nukleotydu lub wielu (następujących po kolei) nukleotydów w genomie.

Elektroporacja: zastosowanie impulsów elektrycznych w celu zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych.

Gen endogenny: gen natywny genomu.

Zmienność ponad dwumianowa: zmienność w powtórzonych szacunkach odsetka populacji przewyższająca zmienność, której oczekiwano by, jeżeli dana populacja ma rozkład dwumianowy.

Mutacja spowodowana zmianą fazy odczytu: mutacja genetyczna spowodowana dodaniem lub usunięciem liczby nukleotydów niepodzielnej przez trzy w sekwencji nukleodytów kodującej białko/peptyd.

Insercja: dodanie co najmniej jednej pary zasad azotowych nukleotydów do sekwencji DNA.

Kumulacja (ang. *jackpot*): duża liczba mutacji powstałych w drodze ekspansji klonalnej z pojedynczej mutacji.

Duże delecje: delecje zachodzące w DNA więcej niż kilka kilopar zasad (które są skutecznie wykrywane w badaniach selekcji Spi^- i plazmidu z genem lacZ).

Ligacja: łącznie kowalencyjne dwóch końców cząsteczek DNA z zastosowaniem ligazy DNA.

Mitogen: substancja chemiczna stymulująca komórkę do rozpoczęcia podziału komórki, wywołująca mitozę (tj. podział komórki).

Gen neutralny: gen, na który nie mają wpływu ani pozytywne ani negatywne oddziaływania selektywne.

Pakowanie: synteza zakaźnych cząsteczek fagowych z preparatu kapsydu faga i białek końcowych i konkatameru cząsteczek DNA faga. Powszechnie stosowane do pakowania DNA sklonowanego na wektor lambda (odizolowany przez regiony cos) do zakaźnych cząsteczek lambda.

Wydajność pakowania: wydajność, z którą spakowane bakteriofagi są odzyskiwane w bakterii będącej gospodarzem.

Jednostka tworząca łysinki (pfu): miary liczby żywotnych bakteriofagów.

Mutacja punktowa: ogólne pojęcie oznaczające mutację mającą wpływ na małą sekwencję DNA, w tym małe insercje, delecje i substytucje par zasad.

Selekcja dodatnia: metoda umożliwiająca przetrwanie jedynie mutacji.

Gen reporterowy: gen, którego produkt modyfikacji genowej jest łatwy do wykrycia.

Czas pobierania próbek: koniec okresu przed uśmierceniem, podczas którego nie podaje się substancji chemicznej, a uszkodzenia DNA zostają utrwalone w postaci stabilnych mutacji.

Wektor wahadłowy: wektor zbudowany tak, aby mógł się namnażać w dwóch różnych gatunkach gospodarzy; zatem DNA wstawione do wektora wahadłowego można badać lub można nim manipulować w dwóch różnych rodzajach komórek lub w dwóch różnych organizmach.

Badana substancja chemiczna: oznacza każdą substancję lub mieszaninę badaną za pomocą opisywanej metody badawczej.

Transgeniczny: należący do organizmu, którego genom został zmieniony w wyniku przeniesienia genu lub genów z innego gatunku; związany z takim organizmem lub będący takim organizmem.".

ISSN 1977-0766 (wydanie elektroniczne)
ISSN 1725-5139 (wydanie papierowe)

Urząd Publikacji Unii Europejskiej
2985 Luksemburg
LUKSEMBURG

PL