

32000L0032

L 136/1

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

8.6.2000

DIREKTIVA KOMISIJE 2000/32/ES**z dne 19. maja 2000****o šestindvajseti prilagoditvi direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi tehničnemu napredku (*)****(Besedilo velja za EGP)**

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 67/548/EGS z dne 27. junija 1967 o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi ⁽¹⁾, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo Evropskega parlamenta in Sveta 1999/33/ES ⁽²⁾, in zlasti člena 28 Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Priloga I k Direktivi 67/548/EGS vsebuje seznam nevarnih snovi, skupaj s podrobnostmi o razvrščanju in označevanju vsake snovi. Sedanja znanstvena in tehnična znanja so pokazala, da bi bilo treba seznam nevarnih snovi v tej prilogi prilagoditi. V nekaterih jezikovnih različicah Direktive so pri posameznih oddelkih uvoda in tabele A v Prilogi I potrebni popravki.
- (2) Priloga III k Direktivi 67/548/EGS vsebuje seznam stavkov o vrsti posebnih tveganj, povezanih z nevarnimi snovmi in pripravki. Priloga IV k Direktivi 67/548/EGS vsebuje seznam stavkov o varnostnih nasvetih, ki veljajo za nevarne snovi in pripravke. Priloga VI k Direktivi 67/548/EGS vsebuje priročnik o razvrščanju in označevanju nevarnih snovi in pripravkov. V nekaterih jezikovnih različicah Direktive so pri posameznih oddelkih priloge III, IV in VI potrebni popravki.
- (3) Priloga V k Direktivi 67/548/EGS določa metode za določanje fizikalno-kemijskih lastnosti, toksičnosti ter ekotoksičnosti snovi in pripravkov. To prilogo je treba prilagoditi tehničnemu napredku.
- (4) Priloga IX k Direktivi 67/548/EGS vsebuje določbe o

zapirali, varnih za otroke. Te določbe naj bi se prilagodile in posodobile. Treba je razširiti področje uporabe zapiral, varnih za otroke.

- (5) Ukrepi, predvideni s to direktivo, so v skladu z mnenjem Odbora za prilagajanje tehničnemu napredku direktiv o odpravljanju tehničnih ovir pri trgovanju z nevarnimi snovmi in pripravki –

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Direktiva 67/548/EGS se spremeni:

1. Priloga I se spremeni:

- (a) Opomba Q iz Priloge 1A k tej direktivi nadomesti ustrezno opombo v uvodu.
- (b) Vrstice iz Priloge 1B k tej direktivi nadomestijo ustrezne vrstice v tabeli A.
- (c) Vpisi v Prilogi 1C k tej direktivi nadomestijo ustrezne vpise.
- (d) Vstavijo se vpisi iz Priloge 1D k tej direktivi.

2. Stavek R iz Priloge 2 k tej direktivi nadomesti ustrezni stavek v Prilogi III.

3. Priloga IV se spremeni:

- (a) Stavki S iz Priloge 3A k tej direktivi nadomestijo ustrezne stavke v Prilogi IV.

(*) Sprejeta po 27. prilagoditvi.

⁽¹⁾ UL 196, 16.8.1967, str. 1.

⁽²⁾ UL L 199, 30.7.1999, str. 57.

- (b) Sestavljeni stavki S iz Priloge 3B k tej direktivi nadomestijo ustrezne stavke v Prilogi IV.

4. Del B Priloge V se spremeni:

- (a) Besedilo iz Priloge 4A k tej direktivi nadomesti poglavje B.10.
- (b) Besedilo iz Priloge 4B k tej direktivi nadomesti poglavje B.11.
- (c) Besedilo iz Priloge 4C k tej direktivi nadomesti poglavje B.12.
- (d) Besedilo iz Priloge 4D k tej direktivi nadomesti poglavji B.13 in B.14.
- (e) Besedilo iz Priloge 4E k tej direktivi nadomesti poglavje B.17.
- (f) Besedilo iz Priloge 4F k tej direktivi nadomesti poglavje B.23. Naslov poglavja B.23 in pojasnilo se ustrezno spremenita.
- (g) Doda se besedilo iz Priloge 4G k tej direktivi.

5. Četrta alineja splošnega uvoda k delu C Priloge V se črta.

6. Del i besedila iz Priloge 5 k tej direktivi nadomestijo ustrezne dele besedila v Prilogi VI.

7. Priloga IX se spremeni, kakor je določeno v Prilogi 6 k tej direktivi.

Člen 2

1. Države članice sprejmejo zakone in druge predpise, potrebne za usklajitev s to direktivo, najpozneje do 1. junija 2001. O tem takoj obvestijo Komisijo.

Države članice se v sprejetih predpisih sklicujejo na to direktivo ali pa sklic nanjo navedejo ob njihovi uradni objavi. Način sklicovanja določijo države članice.

2. Države članice predložijo Komisiji besedila temeljnih predpisov nacionalne zakonodaje, sprejete na področju, ki ga ureja ta direktiva, in tabelo skladnosti med to direktivo in sprejetimi nacionalnimi predpisi.

Člen 3

Ta direktiva začne veljati tretji dan po objavi v *Uradnem listu Evropskih skupnosti*.

Člen 4

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 19. maja 2000

Za Komisijo

Margot WALLSTRÖM

Članica Komisije

PRILOGA 1A

UVOD K PRILOGI I

Razlaga opomb v zvezi z identifikacijo, razvrščanjem in označevanjem snovi

DA:

Note Q:

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

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

SV:

Note Q:

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

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

(Ne zadeva različice ES)

(Ne zadeva različice DE)

(Ne zadeva različice EL)

(Ne zadeva različice EN)

(Ne zadeva različice FR)

(Ne zadeva različice IT)

(Ne zadeva različice NL)

(Ne zadeva različice PT)

(Ne zadeva različice FI)

PRILOGA IB
TABELA A

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

PRILOGA 1C

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
006-011-00-7	karbaril (ISO) 1-naftil metilkarbammat		200-555-0	63-25-2	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-40-50 S: (2-22-24-36/37-46-61		
006-013-00-8	metam-natrij (ISO) natrijev N-metilditiokarbamat		205-293-0	137-42-8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-31-34-43-50/53 S: (1/2-26-36/37/39-45-60-61		
006-015-00-9	diuron (ISO) 3-(3,4-diklorofenil)- 1,1-dimetilsečnina		206-354-4	330-54-1	Karc. kat. 3; R40 Muta. kat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-50/53 S: (2-13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoksur (ISO) 2-izopropoksifenil N-metilkarbammat2-izopropoksifenil metilkarbammat		204-043-8	114-26-1	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-37-45-60-61		
006-017-00-X	aldikarb (ISO) 2-metil-2-(metitio)propionaldehid-O-(metilkarbamoi) oksim		204-123-2	116-06-3	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
006-018-00-5	aminokarb (ISO) 4-dimetilamino-3-tolilmetil karbammat		217-990-7	2032-59-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
006-019-00-0	dialat (ISO) S-(2,3-dikloroalil) diizopropiltiokarbamat		218-961-1	2303-16-4	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-25-36/37-60-61		
006-020-00-6	barban (ISO) (4-klorobut-2-inil)- 3-klorofenilkarbammat		202-930-4	101-27-9	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-24-36/37-60-61		
006-023-00-2	merkaptodimetur (ISO) metiokarb 3,5-dimetil-4-metiltiofenil N-metilkarbammat		217-991-2	2032-65-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-22-37-45-60-61		
006-024-00-8	proksan-natrij (ISO) natrijev O-izopropil ditiokarbamat		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-13-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
006-026-00-9	karbofuran (ISO) 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il N-metilkarbamat		216-353-0	1563-66-2	T+; R26/28 N; R50-53	T+; N R: 26/28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
006-028-00-X	dinobuton (ISO) 2-sek — butil-4,6-dinitrofenil)izopropil karbo- nat		213-546-1	973-21-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
006-029-00-5	dioksakarb (ISO) 2-(1,3-dioksolan-2-il)fenil metilkarbamat		230-253-4	6988-21-2	T; R25 N; R51-53	T; N R: 25-51/53 S: (1/2-)37-45-61		
006-033-00-7	metoksuron (ISO) 3-(3-kloro-4-metoksifenil)- 1,1-dimetilsečnina		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulat (ISO) S-propil-butiletitiokarbamat		214-215-4	1114-71-2	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)23-61		
006-035-00-8	pirimikarb (ISO) 5,6-dimetil-2-dimetilamino-pirimidin-4-il-N, N-dimetilkarbamat		245-430-1	23103-98-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2)22-37-45-60-61		
006-037-00-9	promekarb (ISO) 3-izopropil-5-metilfenil N-metilkarbamat		220-113-0	2631-37-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)24-37-45-60-61		
006-038-00-4	sulfalat (ISO) 2-kloroalil dietilditiokarbamat	E	202-388-9	95-06-7	Karc. kat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	trialat (ISO) S-2,3,3-trikloroalil diizopropiltiokarbamat		218-962-7	2303-17-5	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
006-042-00-6	monuron (ISO) 3-(4-klorofenil)- 1,1-dimetilsečnina		205-766-1	150-68-5	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-043-00-1	monuron-TCA 3-(4-klorofenil)- 1,1-dimetiluronijev trikloroacetat		—	140-41-0	Xi; R36/38 Karc. kat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
006-045-00-2	metomil (ISO) 1-metiltoetiliden-aminometil karbamat		240-815-0	16752-77-5	T+; R28 N; R50-53	T+; N R: 28-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
006-046-00-8	bendiokarb (ISO) 2,2-dimetil-1,3-benzodioskso-4-il metilkarbamat		245-216-8	22781-23-3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
006-047-00-3	bufenkarb (ISO) zmes 3-(1-metilbutil)fenilmetilkarbamata in 3-(1-etilpropil)fenilmetilkarbamata		—	8065-36-9	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
006-048-00-9	etiofenkarb (ISO) (2-etiltiometil)fenilmetilkarbamat		249-981-9	29973-13-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
006-050-00-X	fenuron-TCA 1,1-dimetil feniluronijev trikloroacetat		—	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-60-61		
006-053-00-6	izopropkarb (ISO) 2-izopropilfenilmetilkarbamat o-kumenilmetilkarbamat		220-114-6	2631-40-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
006-054-00-1	meksakarb (ISO) 4-dimetilamino-3,5-ksililmetil karbamat		206-249-3	315-18-4	T+; R28 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-28-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
006-057-00-8	nitrapirin (ISO) 2-kloro-6-triklorometilpiridin		217-682-2	1929-82-4	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-24-61		
006-060-00-4	oksikarboks (ISO) 2,3-dihidro-6-metil-5-fenilkarbamoi)- 1,4-oksitiin 4,4-dioksid 5,6-dihidro-2-metil-1,4-oksitiin-3-karboksamilid-4,4-dioksid		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-61		
006-069-00-3	tiofanat metil (ISO) dimetil 4,4'-(o - fenilen)bis(3-tioalofanat)		245-740-7	23564-05-8	Muta. kat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-36/37-60-61		
006-070-00-9	furmecikloks N-cikloheksil-N-metoksi-2,5-dimetil-3-furamid		262-302-0	60568-05-0	Karc. kat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-36/37-60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
006-088-00-7	benfuracarb (ISO) etil N-[2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-iloksikarbonil(metil)aminotio]-N-izopropil-β-alaninat		—	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
007-012-00-5	N, N-dimetilhidrazin 1,1-dimetilhidrazin	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Karc. kat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/25-34-51/53 S: 53-45-61		
007-013-00-0	1,2-dimetilhidrazin	E	—	540-73-8	Karc. kat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %; T; R45-23/24/25 3 % < C < 25 %; T; R45-20/21/22 0,01 % < C < 3 %; T; R45	
009-003-00-1	fluorovodikova kislina... %	B	231-634-8	7664-39-3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28-35 S: (1/2-7)9-26-36/37-45	C ≥ 7 %; T+; C; R26/27/28-35 1 % ≤ C < 7 %; T; R23/24/25-34 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20/21/22-36/37/38	
015-039-00-9	azinfos metil (ISO) O, O-dimetil-S-(4-oksobenzotriazin-3-il) metil ditiofosfat		201-676-1	86-50-0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-43-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-048-00-8	fention (ISO) O, O-dimetil-O-(4-metilio-m-tolil)tiofosfat		200-231-9	55-38-9	Muta. kat. 3; R40 T; R23-48/25 Xn; R21/22 N; R50-53	T; N R: 21/22-23-40-48/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
015-056-00-1	azinfos etil (ISO) O, O-dietil-S-(4-oksobenzotriazin-3-il) metil ditiofosfat		220-147-6	2642-71-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-28-36/37-45-60-61		
015-140-00-8	triazofos (ISO) O, O-dietil-O-(1-fenil-1,2,4-triazol-3-il) tiofosfat		245-986-5	24017-47-8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-50/53 S: (1/2-3)6/37-45-60-61		
016-013-00-X	žveplov diklorid		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
016-014-00-5	žveplov tetraklorid		—	13451-08-6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-26-36/37/39-45-61	C ≥ 10 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi;R36/37/38	
016-023-00-4	dimetilsulfat	E	201-058-1	77-78-1	Karc. kat. 2; R45 Muta. kat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-4 5	C ≥ 25 %; T+;R45-25-26-34-43 10 % ≤ C < 25 %; T+;R45-22-26-34-43 7 % ≤ C < 10 %; T+;R45-22-26-36/37/38-43 5 % ≤ C < 7 %; T+;R45-22-23-36/37/38-43 3 % ≤ C < 5 %; T+;R45-22-23-43 1 % ≤ C < 3 %; T+;R45-23-43 0,1 % ≤ C < 1 %; T;R45-20 0,01 % ≤ C < 0,1 %;T;R45	
016-024-00-X	dimeksano (ISO) bis (metoksi tiokarbonil) disulfid		215-993-8	1468-37-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
016-071-00-6	trinatrijev 3-amino-6,1,3-dikloro-10-(3-(4-kloro-6-(2-sulfofenilamino)- 1,3,5-triazin-2-il)amino)propil)amino)- 4,1,1-trifenoksidoksazin disulfonat		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2-22-24-37		
022-001-00-5	titan tetraklorid		231-441-9	7550-45-0	R14 C; R34	C R: 14-34 S: (1/2-7/8-26-36/37/39-45	C ≥ 10 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi;R36/37/38	
030-004-00-8	cinkdimetil [1] cinkdietil [2]		208-884-1 [1] 209-161-3 [2]	544-97-8 [1] 557-20-0 [2]	R14 F; R17 C; R34 N; R50-53	F; C; N R: 14-17-34-50/53 S: (1/2-16-43-45-60-61		
050-002-00-0	ciheksatin (ISO) hidroksitricikloheksilkositer tri(cikloheksil) kositrov hidroksid		236-049-1	13121-70-5	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-13-60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
050-012-00-5	tetraklorohexilfosfor [1] klorotricikloheksilfosfor [2] butiltricikloheksilfosfor [3]		215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2)-26-28-60-61	C ≥ 1 %; Xn; R20/21/22	1
050-017-00-2	fenbutatin oksid (ISO) bis(tris(2-metil-2-fenilpropil)fosfor)oksid		236-407-7	13356-08-6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26-36/38-50/53 S: (1/2)-28-36/37-45-60-61		
082-009-00-X	C. I. Pigment Yellow 34[Ta snov je v barvnem indeksu identificirana s številko barvnega indeksa, C. I. 77603.]		215-693-7	1344-37-2	Karc. kat. 3; R40 Repr. kat. 1; R61 Repr. kat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
082-010-00-5	C. I. Pigment red 104[Ta snov je v barvnem indeksu identificirana s številko barvnega indeksa C. I. 77605.]		235-759-9	12656-85-8	Karc. kat. 3; R40 Repr. kat. 1; R61 Repr. kat. 3; R62 R33 N; R50-53	T; N R: 61-33-40-50/53-62 S: 53-45-60-61		1
601-024-00-X	kumol [1] propilbenzen [2]		202-704-5 [1] 203-132-9 [2]	98-82-8 [1] 103-65-1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51-53	Xn; N R: 10-37-51/53-65 S: (2)-24-37-61-62		4
601-032-00-3	benzo(a) piren benzo(d, e, f) krizen		200-028-5	50-32-8	Karc. kat. 2; R45 Muta. kat. 2; R46 Repr. kat. 2; R60-61 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
601-034-00-4	benzo(e) acefenantilen		benzo(b) fluoroanten 205-911-9	205-99-2	Karc. kat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-diklorobenzen p - diklorobenzen		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2)-24/25-46-60-61		
602-054-00-6	3-jodopropen aliljodid		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2)-7-26-45		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
603-076-00-9	but-2-in-1,4-diol 2-butin-1,4-diol		203-788-6	110-65-6	T; R23/25 Xn; R21-48/22 C; R34	T R: 21-23/25-34-48/22 S: (1/2-26-36/37/39-45	C ≥ 50 %; T: R21-23/25-34-48/22 25 % ≤ C < 50 %; T: R21-23/25-36/38-48/22 10 % ≤ C < 25 %; Xn; R20/22-48/22 3 % ≤ C < 10 %; Xn; R20/22	
603-091-00-0	ekso-4-izopropil-1-metil-1,4-epoksicikloheksan-2-ol		402-470-6	87172-89-2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8-22-36 S: (2-26		
603-093-00-1	ekso-(+)-1-metil-2-(2-metil-benziloksi)-4-izopropil-7-oksabociklo(2.2.1)heptan		402-410-9	87818-31-3	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-23-61		
603-097-00-3	1,1', 1'-nitrilopropiran-2-ol trizopropanolamin		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R: 36-52/53 S: (2-26-61		
603-117-00-0	propan-2-ol izopropil alkohol izopropanol		200-661-7	67-63-0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11-36-67 S: (2-7-16-24/25-26	6	
604-020-00-6	bifenil-2-ol 2-hidroksibifenil 2-fenilfenol (ISO)		201-993-5	90-43-7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38-50 S: (2-22-61		
604-021-00-1	natrijev bifetil-2-il oksid		205-055-6	132-27-4	Xn; R22 Xi; R37/38-41 N; R50	Xn; N R: 37/38-41-50 S: (2-22-26-61		
604-024-00-8	4,4'-izobutil etilidendifenol (alt.): 2,2-bis(4'hidroksifenil)-4-metilpentan		401-720-1	6807-17-6	Repr. kat. 2; R60 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 60-36-50/53 S: 53-45-60-61		
604-041-00-0	acifluorfen [1] natrijev acifluorfen [2] 5-[2-kloro-4-(trifluorometil)fenoksi]-2-nitrobenzojska kislina [1] natrijev-5-[2-kloro-4-(trifluorometil)fenoksi]-2-nitrobenzoat [2]		256-634-5 [1] 263-560-7 [2]	50594-66-6 [1] 62476-59-9 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-24-39-60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
604-043-00-1	monobenzen 4-hidroksifenil benzil eter hidrokinon monobenzil eter		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-24/25-26-37		
604-044-00-7	mekinol 4-metoksifenol hidrokinon monomentil eter		205-769-8	150-76-5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-24/25-26-37/39-46		
605-016-00-7	glioksal... % etandial... %	B	203-474-9	107-22-2	Muta. kat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-40-43 S: (2-36/37	C ≥ 10 %; Xn;R20-36/38-40-43 1 % ≤ C < 10 %; Xn;R40-43	
606-016-00-X	pindon (ISO) 2-pivalolindan-1,3-dion		201-462-8	83-26-1	T; R25-48/25 N; R50-53	T; N R: 25-48/25-50/53 S: (1/2-37-45-60-61		
606-018-00-0	diklon (ISO) 2,3-dikloro-1,4-naftokinon		204-210-5	117-80-6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-26-60-61		
606-019-00-6	klordekon (ISO) dekakloropentaciklo[5,2,1,0 ^{2,6} , 0 ^{3,9} , 0 ^{5,8}]dekan-4-on		205-601-3	143-50-0	Karc. kat. 3; R40 T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-40-50/53 S: (1/2-22-36/37-45-60-61		
606-034-00-8	metribuzin (ISO) 4-amino-6-terc-butil-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-on 4-amino-4,5-dihidro-6-(1,1-dimetiltetil)-3-metiltio-1,2,4-triazin-5-on		244-209-7	21087-64-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-60-61		
606-035-00-3	kloridazon (ISO) 5-amino-4-kloro-2-fenilpiridazin-3-on pirazon		216-920-2	1698-60-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-24-37-60-61		
606-036-00-9	kinometionat (ISO) 6-metil-1,3-ditiolo(4,5-b)kinoksalin-2-on		219-455-3	2439-01-2	Repr. kat. 3; R62 Xn;R20/21/22-48/22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-36-43-48/22-50/53-62 S: (2-24-37-60-61		
606-037-00-4	triadimefon (ISO) 1-(4-klorofenoksi)- 3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)butanon		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
606-044-00-2	2,4,6-trimetil benzo fenon		403-150-9	954-16-5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-50/53 S: (2)-26-60-61		
607-043-00-X	dikamba (ISO) 2,5-dikloro-6-metoksibenzojeva kislina 3,6-dikloro-2-metoksibenzojeva kislina		217-635-6	1918-00-9	Xn; R22 Xi; R41 R52-53	Xn; N R: 22-41-52/53 S: (2)-26-61		
607-057-00-6	kumaklor (ISO) 3-[1-(4-klorofenil)-3-oksobutil]-4-hidroksi-kumarin		201-378-1	81-82-3	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2)-37-61		
607-058-00-1	kumafuril (ISO) fumarin 3-[1-(2-furil)-3-oksobutil]-4-hidroksikumarin 4-hidroksi-2-[3-okso-1-(2-furil)butil]kumarin		204-195-5	117-52-2	T; R25-48/25 R52-53	T R: 25-48/25-52/53 S: (1/2)-37-45-61		
607-079-00-6	kelevan (ISO) etil-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-dekalkloro-4-hidroksipentaciklo(5,2,1,0 ^{2,6} , 0 ^{3,9} , 0 ^{5,8})dec-4-il)-4-oksovalerat		—	4234-79-1	T; R24 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 22-24-51/53 S: (1/2)-36/37-45-61		
607-097-00-4	anhidrid-1,2,4-benzotrikarboksilne kisline anhidrid trimelitne kisline		209-008-0	552-30-7	Xi; R37-41 R42/43	Xn R: 37-41-42/43 S: (2)-22-26-36/37/39		
607-143-00-3	valerianska kislina		203-677-2	109-52-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2)-26-36-45-61		
607-152-00-2	2,3,6-TBA (ISO) 2,3,6-triklorobenzojeva kislina		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2)-61		
607-153-00-8	benazolin (ISO) 4-kloro-2,3-dihidro-2-okso-1,3-benzotiazol-3-ilocetna kislina 4-kloro-2-oksobenzotiazolin-3-ilocetna kislina		223-297-0	3813-05-6	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2)-22-61		
607-156-00-4	klorfenson (ISO) 4-klorofenil-4-klorobenzenesulfonat		201-270-4	80-33-1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-50/53 S: (2)-37-60-61		
607-158-00-5	natrijeva sol kloroocetne kisline natrijev kloroacetat		223-498-3	3926-62-3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25-38-50 S: (1/2)-22-37-45-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za pripravke
607-159-00-0	klorobenzilat (ISO) etil-4,4'-diklorobenzilat		208-110-2	510-15-6	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
607-176-00-3	zmes: α-3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroksifenil)propionil-ω-hidroksipoli-(oksietilena):α-3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroksifenil)-propionil-ω-3-(3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroksifenil)-propionilokspoli(oksietilena)		400-830-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-36/37-61		
607-188-00-9	natrijev hidrogen-N-karboksietil-N-oktadek-9-enilmaleamat		402-970-4	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24/37-61		
607-209-00-1	zmes: O, O'-diizopropil(tritio)ditiioformata; O, O'-diizopropil(tetratio)ditiioformata; O, O'-diizopropil(pentatio)ditiioformata;		403-030-6	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/ 53 S: (2)-36/37-60-61		
607-213-00-3	etil-3,3-bis[(1,1-dimetilpropil)peroksi]butirat etil 3,3-bis(terc-pentilperoksi)butirat		403-320-2	67567-23-1	E; R2 O; R7 R10 N; R51-53	E; N R: 2-7-10-51/53 S: (2)-3/7-14-33-36/37/39-61		
607-217-00-5	2-etoksietil-2-[4-(2,6-dihidro-2,6-diokso-7-fenil-1,5-dioksaindacen-3-il)fenoksi]acetat		403-960-2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2)-24-37-61		
607-243-00-7	natrijev 3,6-dikloro-o-anisat [1] 3,6-dikloro-o-anisinska kislina, spojina z 2,2'-iminodietanolom (1:1) [2] 3,6-dikloro-o-anisinska kislina, spojina z 2-aminoetanolom (1:1) [3]		217-846-3 [1] 246-590-5 [2] 258-527-9 [3]	1982-69-0 [1] 25059-78-3 [2] 53404-28-7 [3]	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-248-00-4	natrijev naptalam natrijev N-1-naftilfalamat		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
607-249-00-X	(1-metil-1,2-etandiol)bis(oksi(metil-2,1-etandiol)diakrilat		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R:36/37/38-43-51/53 S: (2-)/24-37-61	C ≥ 10 %; Xi; R36/37/38-43 1 % ≤ C < 10 %; Xi; R43	
607-252-00-6	lambda-sihalotrin (ISO) zmes 1:1 (S)-α - ciano-3-fenoksibenzil(Z)-(1R)-cis-3-(2-kloro-3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilat in (R)-α - ciano-3-fenoksibenzil(Z)-(1S)-cis-3-(2-kloro-3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilat		415-130-7	91465-08-6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T+; N R: 21-25-26-50/53 S: (1/2-) 28-36/37/39-38-45-60-61		
607-255-00-2	fluroksipir (ISO) 4-amino-3,5-dikloro-6-fluoro-2-piridiloksiocetna kislina		—	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	akrilonitril	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Karc. kat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23-/ 24/25-37/38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 20 %; T; R45-23/24/25-37/ 38-41-43 10 % ≤ C < 20 %; T; R45-23/24/25-41-43 5 % ≤ C < 10 %; T; R45-23/24/25-36-43 1 % ≤ C < 5 %; T; R45-23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %; T; R45-20/21/22 0,1 % ≤ C < 0,2 %; T; R45	
608-016-00-5	1,4-diciano-2,3,5,6-tetraklorobenzen		401-550-8	1897-41-2	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)/24-37-60-61		
609-030-00-4	dinoterb (ISO) 2-terc-butil-4,6-dinitrofenol	E	215-813-8	1420-07-1	Repr. kat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50-53	T+; N R: 61-24-28-44-50/53 S: 53-45-60-61		
609-040-00-9	nitrofen (ISO) 2,4-diklorofenil 4-nitrofenileter	E	217-406-0	1836-75-5	Karc. kat. 2; R45 Repr. kat. 2; R61 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-61-22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-044-00-0	teknazen (ISO) 1,2,4,5-tetrakloro-3-nitrobenzen		204-178-2	117-18-0	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)/24-37-60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
611-008-00-4	4-aminoazobenzen 4-fenilazaniin		200-453-6	60-09-3	Karc. kat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	trilitijev 4-hidroksi-3-(4-(2-metoksi-4-(3-sulfonatofenilazo)fenilazo)-3-metilfenilazo)-6-(3-sulfonatoanilino)naftalen-2-sulfonat		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-031-00-X	4,4'-(4-iminocikloheksa-2,5-dienilidenmetilene)-dianilin hidroklorid C. I. Basic Red 9		209-321-2	569-61-9	Karc. kat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-metoksianilin o - anisidin	E	201-963-1	90-04-0	Karc. kat. 2; R45 Muta. kat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	benzidin 1,1'-bifenil-4,4'-diamin 4,4'-diaminobifenil bifenil-4,4'-ilendiamin	E	202-199-1	92-87-5	Karc. kat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %; T; R45-22 0,01 % ≤ C < 25 %; T; R45	
612-051-00-1	4,4'-diaminodifenilmetan 4,4'-metilendianilin	E	202-974-4	101-77-9	Karc. kat. 2; R45 Muta. kat. 3; R40 T; R39/23/24/25Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/ 20/21/22-51/53 S: 53-45-61		
612-081-00-5	3,3'-dimetilbenzidinijske soli o - tolidinove soli	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Karc. kat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-metil-m - fenilendiamin 2,4-toluendiamin	E	202-453-1	95-80-7	Karc. kat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
612-105-00-4	2-piperazin-1-iletiamin		205-411-0	140-31-8	Xn; R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Majhne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
612-111-00-7	2-metil- <i>m</i> - fenilendiamin 2,6-toluendiamin		212-513-9	823-40-5	Muta. kat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-40-43-51/53 S: (2-24-36/37-61		
612-125-00-3	2-metil- <i>p</i> -fenilendiamin 2,5-toluendiamin		202-442-1	95-70-5	T; R25 Xn; R20/21 R43 N; R51-53	T; N R: 20/21-25-43-51/53 S: (1/2-24-37-45-61		
612-144-00-7	flumetralin (ISO) N-(2-kloro-6-fluorobenzil)-N - etil- <i>α,α,α</i> - trifluoro-2,6-dinitro- <i>p</i> - toluidin		—	62924-70-3	Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-43-50/53 S: (2-36/37-60-61		
612-151-00-5	diaminotoluen		246-910-3	25376-45-8	Karc. kat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-018-00-4	morfamkvat (ISO) 1,1'-bis(3,5-dimetilmorfolinokarbonil-metil)- 4,4'-bipiridin		—	7411-47-4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn R: 22-36/37/38-52/53 S: (2-22-36-61		
613-031-00-5	trikloroizocianurna kislina 1,3,5-trikloro-1,3,5-triazin-2,4,6-trion		201-782-8	87-90-1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50-53	O; Xn; N R: 8-22-31-36/37-50/53 S: (2-8-26-41-60-61		
613-038-00-3	6- fenil-1,3,5-triazin-2,4-diamin benzoguanamin		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-61		
613-042-00-5	imazalil (ISO) 1-[2-(aliloksi)-2-(2,4-diklorofenil)etil]- 1H-imida- zol		252-615-0	35554-44-0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-26-39-60-61		
613-043-00-0	imazalil sulfat (ISO) 1-[2-(aliloksi)etil-2-(2,4-diklorofenil)]- 1H- imidazolijev hidrogensulfat [1] (±)-1-[2-(aliloksi)etil-2-(2,4-diklorofenil)]- 1H-imidazolijev hidrogensulfat [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-26-39-60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
613-066-00-6	terbumeton (ISO) 2-terc-butilamino-4-etilamino-6-metoksi-1,3,5-triazin		251-637-8	33693-04-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2)-60-61		
613-091-00-2	morfamkvat diklorid [1] morfamkvat sulfat [2]		225-062-8 [1]	4636-83-3 [1] 29873-36-7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52-53	Xn; R: 22-36/37/38-52/53 S: (2)-22-36-61		
613-098-00-0	N - (n-oktil)-2-pirolidon		403-700-8	2687-94-7	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2)-23-26-36/37/39-45-61		
613-130-00-3	heksakonazol (ISO) (RS)-2-(2,4-diklorofenil)-1-((1H-1,2,4-triazol-1-il)heksan-2-ol		—	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
613-131-00-9	pirokilon (ISO) 1,2,5,6-tetrahidropirol [3,2,1-ij] kinolin-4-on		—	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2)-61		
613-134-00-5	miklobutanil (ISO) 2-(4-klorofenil)-2-((1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)heksan nitril		—	88671-89-0	Repr. kat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51-53	Xn; N R: 22-36-51/53-63 S: (2)-36/37-46-61		
613-137-00-1	metabenzotiazuron (ISO) 1-(1,3-benzotiazol-2-il)1,3-dimetil sečnina		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	metsulfuron-metil metil 2-(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-ilkarbamoijsulfamoi) benzoat		—	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nicotine (ISO) 3-(N-methyl-2-pyrrolidiny)pyridine		200-193-3	54-11-5	T+; R27 T; R25 N; R51-53	T+; N R: 25-27-51/53 S: (1/2)-36/37-45-61		
614-006-00-1	brucin 2,3-dimetoksisirihnin		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2)-13-45-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
614-007-00-7	brucin sulfat [1] brucin nitrat [2] strijhidin-10-on, 2,3-dimetoksi-, mono[(R)-1-metilheptil 1,2-benzendikarboksilat] [3] strijhidin-10-on, 2,3-dimetoksi-, spojine z (S)mono(1-metilheptil-1,2-benzendikarboksilat)om (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-1)3-45-61		
615-006-00-4	2-metil-m-fenilen diizocianat [1] 4-metil-m-fenilen diizocianat [2] m-tolylidene diisocyanate [3] 2,6-diizocianatotoulen [1] 2,4-diizocianatotoulen [2] toluen-diizocianat [3]	C	202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Karc. kat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-2)3-36/37-45-61	C ≥ 20 %; T+; R26-36/37/38-40-42/43 7 % ≤ C < 20 %; T+; R26-40-42/43 1 % ≤ C < 7 %; T; R23-40-42/43 0,1 % ≤ C < 1 %; Xn; R20-42	2
616-010-00-9	natrijev tozilkloramid		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-2)7-22-26-36/37/39-45		
616-034-00-X	pirakarbolid (ISO) 3,4-dihidro-6-metil-2H-piran-5-karboksanilid		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	cimoksanil 2-ciano-N'-(etilamino)karbonil]-2-(metoksitrimino)acetamid		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-3)6/37-60-61		
617-004-00-9	1,2,3,4-tetrahidro-1-naftil hidroperoksid		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-3)7-14-26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %; C; R22-34 10 % ≤ C < 25 %; C; R34 5 % ≤ C < 10 %; Xi; R36/37/38	
617-006-00-X	bis(α, α - dimetilbenzil) peroksid		201-279-3	80-43-3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51-53	O; Xi; N R: 7-36/38-51/53 S: (2-3)7-14-36/37/39-61		
617-008-00-0	dibenzoil peroksid benzoil peroksid		202-327-6	94-36-0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2-36-43 S: (2-3)7-14-36/37/39		
650-007-00-3	klordimeform (ISO) N ² -(4-kloro-o-tolil)-N', N' - dimetilformamidin N-(4-kloro-o-tolil)-N'; N' - dimetilformamidin hidroklorid		228-200-5	6164-98-3	Karc. kat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-22-36/37-60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za pripravke
650-008-00-9	drazoksolon (ISO) 4-(2-klorofenilhidrazono)-3-metil-5-izoksazolon		227-197-8	5707-69-7	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-) 22-24-36/37-45-60-61		
650-009-00-4	klordimeform hidroklorid N' - (4-kloro-o-tolil)-N, N-dimetilformamidin hidroklorid N ² - (4-kloro-o-tolil)-N ¹ , N ¹ - dimetilformamidin hidroklorid		243-269-1	19750-95-9	Karc. kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-22-36/37-60-61		
650-033-00-5	esfenvalerat (ISO) (S)-α - ciano-3-fenoksibenzil-(S)-2-(4-klorofenil)-3-metilbutirat		—	66230-04-4	T; R23/25 R43 N; R50-53	T; N R: 23/25-43-50/53 S: (1/2-24-36/37/39-45-60-61		
650-041-00-9	triasulfuron (ISO) 1-[2-(2-kloroetoksi)fenilsulfonil]-3-(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il) sečnina		—	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

PRILOGA 1D

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za pripravke
006-090-00-8	2-(3-jodoprop-2-in-1-iloksi)etil fenilkarbammat		408-010-0	88558-41-2	Xn; R20 Xi; R41 R52-53	Xn R: 20-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
014-016-00-0	zmes: 1,3-diheks-5-en-1-il-1,1,3,3-tetrametildisiloksana; 1,3-diheks-n-en-1-il-1,1,3,3-tetrametildisiloksana		406-490-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	kalcijev-P, P'-(1-hidroksietilen)bis(hidrogenfosfonat)dihidrat		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R:52/53 S: 61		
015-165-00-4	zmes: tiobis(4,1-fenilen)-S, S', S' - tetrafenildisulfonijskega bisheksafluorofosfata; difenil(4-feniltiofenil)sulfonijskega heksafluorofosfata		404-986-7	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)15-26-39-60-61		
015-166-00-X	3,9-bis(2,6-di-terc-butil-4-metilfenoksi)-2,4,8,10-tetraoksa-3,9-difosfapiro[5.5]undekan		410-290-4	80693-00-1	R53	R:53 S: 61		
015-167-00-5	3-(hidroksifenilfosfinil)propanojska kislina		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	benzen, C ₁₀ T ₁₃ alilni derivati		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-fenilbut-1-en		405-980-7	768-56-9	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
602-083-00-4	difenil eter, pentabrom derivat pentabromodifenileter		251-084-2	32534-81-9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50-53	Xn; N R: 48/21/22-50/53-64 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
602-084-00-X	1,1-dikloro-1-fluorocetan		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(phenylmethoxy)naphthalene		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
603-129-00-6	1-tert-butoxypropan-2-ol		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603-130-00-1	zmes izomer: α - ((dimetil)bifenil)- ω - hidroksipoli (oksietilena)		406-325-8	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)39-61		
603-131-00-7	zmes 3:1: 1-deoksi-1-[metil-(1-okso-dodecil)-amino]-D-glucitola; 1-deoksi-1-[metil-(1-okso-tetradecil)amino]-D-glucitola		407-290-1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-132-00-2	2-hidroksimetil-9-metil-6-(1-metiletil)- 1,4-dioksaspiro[4,5]dekan		408-200-3	63187-91-7	Xi; R38-41 R52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
603-133-00-8	zmes: 3-[(4-amino-2-kloro-5-nitrofenil)amino]-propan-1,2-diola; 3'-(2-kloro-5-nitro-1,4-fenilendiimino)bis(propan-1,2-diola)		408-240-1	—	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-36-61		
603-134-00-3	Zmes substituiranih dodecil in/ali tetradecil difenil etrov. Snov se proizvode s Friedel-Craftsovo reakcijo. Katalizator se odstrani iz reakcijskega produkta. Difenil eter se substituiral z alkinimi skupinami C1-C10. Alkinne skupine se naključno vežejo med C1 in C6. Uporabijo se nerazvejani alkani C12 in C14, 50/50.		410-450-3	—	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2', 2-nitro-1,3-bis(2-nitrofenil)etanolato]]-1-N, O]bis[2-(2-metoksietoksi)etoksil]-titan		410-500-4	—	Xi; R41 N: R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
603-136-00-4	3-((4-(bis(2-hidroksietil)amino)-2-nitrofenil)-amino)-1-propanol		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
603-137-00-X	zmes: 1-deoksi-1-[metil-(1-oksoheksadecil)-amino]-D-glucitola; 1-deoksi-1-[metil-(1-oksooktadecil)amino]-D-glucitola		411-130-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-dimetil-3-hidroksipropil)toluen alt.): 2,2-dimetil-3-(3-metilfenil)propanol		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
604-050-00-X	4-kloro-o-krezol 4-kloro-2-metil fenol		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R 35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2)-26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %; T; C; R23-35 10 % ≤ C < 25 %; C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %; C; R20-34 3 % ≤ C < 5 %; Xn; R20-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %; Xi; R36/37/38	
604-051-00-5	3,5-bis((3,5-di-terc-butil-4-hidroksi)benzil)-2,4,6-trimetilfenol		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R:52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-metilen-bis(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol)		403-800-1	103597-45-1	R53	R:53 S: 61		
604-053-00-6	2-metil-4-(1,1-dimetil-4-(1-metil-pentadecil)-fenol		410-760-9	157661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2)-24-37-60-61		
604-054-00-1	zmes: 2-metoksi-4-(tetrahydro-4-metilen-2H-piran-2-il)-fenola; 4-(3,6-dihidro-4-metil-2H-piran-2-il)-2-metoksifenola		412-020-0	—	R43 R52-53	Xi R:43-52/53 S: (2)-24-37-61		
604-055-00-7	2,2'-((3,5',5,5'-tetrametil-(1,1'-bifenil)-4,4'-diil)-bis(oksimetilen))-bis-oksiran		413-900-7	85954-11-6	Muta. Kat. 3; R40	Xn R: 40 S: (2)-22-36-37		
605-027-00-7	zmes: 3a, 4,5,6,7,7a-heksahidro-4,7-metano-1H-inden-6-karboksaldehida; 3a, 4,5,6,7,7a-heksahidro-4,7-metano-1H-inden-5-karboksaldehida		410-480-7	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2)-24-37-61		
606-051-00-0	4-pentilcikloheksanon		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N, N-dibutilamino)-2-hidroksi-2'-karboksibenzofenon		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R:52/53 S: 61		
607-272-00-5	fluoroksipir-metil (ISO) [1] fluoroksipir-butometil (ISO) [2] metilheptil O-((4-amino-3,5-dikloro-6-fluoro-2-piridiloksi) acetat [1] 2-butoksi-1-metil-1H-inden-5-ol-2-ylidiloksi) acetat [2]		279-752-9 [1] —	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
607-273-00-0	amonijev 7-(2,6-dimetil-8-(2,2-dimetilbutiril-oksij)-1,2,6,7,8,8a-heksahidro-1-naftil)-3,5-dihidroksiheptanoat		404-520-2	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	2-(N-benzil-N-metilamino)etil-3-amino-2-butenaoat		405-350-1	54527-73-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-275-00-1	natrijev benzoiloksibenzen-4-sulfonat		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-276-00-7	bis[(1-metilmidazol)-(2-etil-heksanoat)], cinkov kompleks		405-635-0	—	Xi: R38-41 N: R50-53	Xi: N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-277-00-2	zmes: 2-(heksilio)etilamin hidroklorida; natrijevega propionata		405-720-2	—	Xn; R22 Xi: R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-278-00-8	zmes izomer natrijevega fenilnaftalensulfonata; natrijevega naftiltilbenszensulfonata		405-760-0	—	Xi: R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-279-00-3	zmes n-oktadecilaminodietil bis(hidrogenmaleata); n-oktadecilaminodietil hidrogen maleat hidrogenftalata		405-960-8	—	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-280-00-9	natrijev 4-kloro-1-hidroksibutan-1-sulfonat		406-190-5	54322-20-2	Xn; R22 Xi: R36 R43	Xn R: 22-36-43 S: (2-)22-26-36/37		
607-281-00-4	zmes razvejanih in nerazvejanih C7-C9 alkil 3-[3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-(1,1-dimetil)-4-hidroksifenil]propionatov		407-000-3	127519-17-9	N: R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	2-acetoksimetil-4-benziloksibut-1-il acetat		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
607-283-00-5	E-etil-4-okso-4-fenilkrotonat		408-040-4	15121-89-8	Xn; R21/22 Xi: R38-41 R43 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-50/53 S: (2-)/26-36/37/39-60-61		
607-284-00-0	zmes 9:1: natrijevega 3,3'-(1,4-fenilen-bis(karbonilimino-3,1-propan-dilimino))bis(10-amino-6,1,3-dikloro)- 4,11-trifenodioksazindisulfonata; litijevega 3,3'-(1,4-fenilen-bis(karbonilimino-3,1-propan-dilimino))bis(10-amino-6,1,3-dikloro)-4,11-trifenodioksazindisulfonata		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	zmes: 7-(((3-amino-fenil)sulfonil)amino)-naftalen-1,3-disulfonske kisline; natrijevega 7-(((3-amino-fenil)sulfonil)amino)-naftalen-1,3-disulfonata; kalijevega 7-(((3-amino-fenil)sulfonil)amino)-naftalen-1,3-disulfonata		410-065-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)/22-24-37		
607-286-00-1	zmes: natrijevega/kalijevega 7-[[[3-[[4-((2-hidroksinaftil)azo)fenil]azo]fenil]sulfonil]amino]-naftalen-1,3-disulfonata		410-070-8	141880-36-6	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)/22-24-37-61		
607-287-00-7	O'-metil O-(1-metil-2-metakrililoksi-etil)-1,2,3,6-tetrahidroftalat		410-140-8	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	tetranatrijev (c-(3-(1-(3-(e-6-dikloro-5-ciano-pirimidin-5-il)metil)amino)propil)- 1,6-dihidro-2-hidroksi-4-metil-6-okso-3-piridilazo)-4-sulfonatofenil-sulfamoi)ftalocianin-a, b, d-trisulfonato(6-))nikelat (II), pri čemer je a enak 1 ali 2 ali 3 ali 4, b je enak 8 ali 9 ali 10 ali 11, c je enak 15 ali 16 ali 17 ali 18, d je enak 22 ali 23 ali 24 ali 25 ter sta e in f skupaj enaka 2 in 4 oziroma 4 in 2.		410-160-7	148732-74-5	Xi: R36 R43 R52-53	Xi R: 36-43-52/53 S: (2-)/22-26-36/37-61		
607-288-00-8	3-(3-(4-(2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoksi)-butilaminokarbomil-4-hidroksi-1-naftalenil)tio)propanojska kislina		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	zmes (razmerje ni znano): amonijevega 1-C14-C18-alkiloksikarbomil-2-(3-aliloksi-2-hidroksi)propoksikarbomil)etan-1-sulfonata; amonijevega 2-C14-C18-alkiloksikarbomil-1-(3-aliloksi-2-hidroksi)propoksikarbomil)etan-1-sulfonata		410-540-2	—	Xi: R38 R43 N: R50-53	Xi: N R: 38-43-50/53 S: (2-)/24-37-60-61		
607-291-00-9	dodecil-ω - (C5/C6-cikloalkil)alkil karboksilat		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za pravke
607-292-00-4	zmes: [1-(metoksimetil)-2-(C12-alkoksi)-etoksi]ocetne kisline; [1-(metoksimetil)-2-(C14-alkoksi)-etoksi]ocetne kisline		410-640-6	—	Xi: R38-41 N: R50-53	Xi: N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
607-293-00-X	zmes: N-aminoetilpiperazonijevga mono-2,4,6-trimetilnomildifenil eter di-sulfonata; N-aminoetilpiperazonijevga di-2,4,6-trimetilnomildifenil eter di-sulfonata		410-650-0	—	Xi: R41 R43 N: R51-53	Xi: N R: 41-43-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
607-294-00-5	natrijev 2-benzoiloksi-1-hidroksietan-1-sulfonat		410-680-4	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-295-00-0	zmes: tetranatrijevga fosfonoetan-1,2-dikarboksilata; heksanatrijevga fosfonobutan-1,2,3,4-tetrakarboksilata		410-800-5	—	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-296-00-6	zmes: pentaetriol-tetraestrov heptanojske kisline in 2-etilheksanojske kisline		410-830-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(E-E)-3,3'-(1,4-fenilendimetiliden)bis(2-oksobornan-10-sulfonska kislina)		410-960-6	92761-26-7	Xi: R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-298-00-7	2-(trimetilamonijev)etoksikarboksibenzen-4-sulfonat		411-010-3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-36/37		
607-299-00-2	metil 3-(acetilto)-2-metil-propanoat		411-040-7	97101-46-7	Xn: R22 R43 N: R50-53	Xn: N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
607-300-00-6	trinatrijev [2-(5-kloro-2,6-difluoropirimidin-4-ilamino)-5-(6-sulfamoil-C, d-sulfonatoftalcianin-a-il-K4, N29, N30, N31, N32-sulfonilamino)benzoato(5-)]kuprat(II), kjer je a = 1, 2, 3, 4; b = 8, 9, 10, 11; c = 15, 16, 17, 18; d = 22, 23, 24, 25		411-430-7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-301-00-1	zmes: dodekanojske kisline; poli(1-7)laktatnih estrov dodekanojske kisline		411-860-5	—	Xi: R38-41 R43 N: R51-53	Xi: N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
607-302-00-7	zmes: tetradekanojske kisline; poli(1-7)laktatnih estrov tetradekanojske kisline		411-910-6	—	Xi: R38-41 R43 Ni: R51-53	Xi: N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-ciklopropil-6,7-difluoro-1,4-dihidro-4-okso-kinolin-3-karboksilna kislina		413-760-7	93107-30-3	Repr. kat. 3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-klorofenil)-2-fenil-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]butan nitril		406-140-2	114369-43-6	Ni: R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butil-N-fenetilamino)fenil)etilen-1,1,2-trikarbonitril		407-650-8	97460-76-9	R53	R:53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis(benziloksi)fenilacetnitril		410-970-0	117568-27-1	R53	R:53 S: 61		
609-053-00-X	hydrazine-tri-nitromethane		414-850-9	—	E: R3 O: R8 Carc. Cat. 2; R45 T: R23/25 R43	E; T R: 45-3-8-23/25-43 S: 53-45		
610-010-00-2	2-bromo-1-(2-furyl)-2-nitroethylene		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C: R34 R43 Ni: R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	zmes 2:1:1: trinatrijevega N(1')-N(2):N(1'')-N(2) - 6-[2-amino-4(ali 6)-hidroksi(ali 4-amino-2-hidroksi)fenilazo]-6-(1-karbanilolil-2-hidroksi)prop-1-enilazo)- 5', 5''- disulfamoil-3,3''- disulfonato-bis(naftalen-2,1'-azobenzen-1,2'-diolato-O(1), O(2))-kromata;trinatrijevega N(1')-N(2):N(1'')-N(2) - 6,6-bis(1-karbanilolil-2-hidroksi)prop-1-enilazo)- 5', 5''- disulfamoil-3,3''- disulfonato-bis(naftalen-2,1'-azobenzen-1,2'-diolato-O(1), O(2))-kromata; trinatrijevega N(1')-N(2):N(1'')-N(2) - 6,6-bis[2-amino-4(ali 6)-hidroksi(ali 4-amino-2-hidroksi)fenilazo]5', 5''- disulfamoil-3,3''- disulfonato-bis(naftalen-2,1'-azobenzen-1,2'-diolato-O(1), O(2))-kromata		402-850-1		Xi: R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
611-044-00-0	zmes: terc-alkil(C12-C14)amonijev bis[1-[(2-hidroksi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromata(1-);terc-alkil(C12-C14)amonijev bis[1-[(2-hidroksi-4-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromata(1-);terc-alkil(C12-C14)amonijev bis[1-[(5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroksi-3-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromata(1-);terc-alkil(C12-C14)amonijev-[[1-[(2-hidroksi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hidroksi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromata(1-);terc-alkil(C12-C14)amonijev-[[1-[(5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroksi-3-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-1-[(2-hidroksi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalenolato(2-)]-kromata(1-);terc-alkil(C12-C14)amonijev ((1-(4(ali 5)-nitro-2-oksidofenilazo)-2-naftolato)(1-(3-nitro-2-oksido-5-pentilfenilazo)-2-naftolato))kromata(1-)	403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61			
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-acetoxibutyl)-N-ethyl]amino-2-methylphenylazo]-3-acetyl-5-nitrothiophene		404-830-8	—	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-diamino-2-methylazobenzene		407-590-2	43151-99-1	T: R25 Xn; R48/22 R43 N: R50-53	T: N R: 25-43-48/22-50/53 S: (1/2)-22-28-36/37-45-60-61		
611-047-00-7	zmes 1:1: 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]-5,6-diklorobenzotiazola; 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]-6,7-diklorobenzotiazola		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	zmes (1:1): 2-[[4-[bis(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]-5,6-diklorobenzotiazola; 2-[[4-[bis(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]-6,7-diklorobenzotiazola		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za pripravke
611-049-00-8	7-[4-(3-diethylaminopropylamino)-6-(3-diethylammonio)propylamino]-1,3,5-triazin-2-ylamino]-4-hydroxy-3-(4-phenylazophenylazo)-naphthalene-2-sulfonate, acetic acid, lactic acid (2:1:1)		408-000-6	118658-98-3	Xn; R48/22 R43 R52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-22-36/37-61		
611-051-00-9	2-(4-(N-ethyl-N-(2-hydroxyethyl)amino-2-methylphenyl)azo-6-methoxy-3-methylbenzothiazolium chloride		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	monosodium aqua-[5-[[2,4-dihydroxy-5-[(2-hydroxy-3,5-dinitrophenyl)azo]phenyl]azo]-2-naphthalenesulfonate], iron complex		400-720-9	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	zmes: triheksadecilmetilamonijevega klorida; diheksadecilmetilamonijevega klorida		405-620-9	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-26-39-60-61		
612-157-00-8	(Z)-1-benzo[b]tien-2-iletanon oksim hidroklorid		410-780-8	—	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-48/22-51/53 S: (2-22-26-36/37/39-61		
612-158-00-3	zmes: bakrovega(II) bis(5-dodecil-2-hidroksibenzoaldotsinata), alikalna skupina C12 je razvejana; 4-dodecilsalicilaldoksima		410-820-4	—	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	reakcijski produkti: trimetilheksameten diamina (zmes 2,2,4-trimetil-1,6-heksandiamina in 2,4,4-trimetil-1,6-heksandiamina, v seznamu EINECS), epoksida 8 (derivati mono[(C10-C16-alkiloksi)metil]-oksirana) in p-toluen-sulfonske kisline		410-880-1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-23-26-36/37/39-45-60-61		
613-149-00-7	2-tert-butyl-5-(4-tert-butylbenzylthio)-4-chloropyridazin-3(2H)-one		405-700-3	96489-71-3	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-36/37-45-60-61		
613-150-00-2	2,2'-[3,3'-(piperazin-1,4-diil)dipropil]bis(1H-benzimidazo[2,1-b]benzo[1, m, n][3,8]fenantrolin-1,3,6-trion		406-295-6	—	R53	R: 53 S: 61		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
613-151-00-8	1-(3-mesyloxy-5-trityloxymethyl-2-D-threofuryl)thymine		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	fenil N-(4,6-dimetoksipirimidin-2-il)karbamat		406-600-2	89392-03-0	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-153-00-9	2,3,5-trichloropyridine		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-chloro-6-methoxyypyrimidine		410-050-9	5734-64-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-kloro-2,3-difluoropiridin		410-090-7	89402-43-7	R10 Xn; R22 R52-53	Xn R: 10-22-52/53 S: (2-)23-36-61		
613-156-00-5	2-butyl-4-chloro-5-formylimidazole		410-260-0	83857-96-9	R43 N: R51-53	Xi: N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-157-00-0	2,4-diamino-5-methoxymethylpyrimidine		410-330-0	54236-98-5	Xn; R22-48/22 Xi: R36	Xn R: 22-36-48/22 S: (2-)22-26-36		
613-158-00-6	2,3-dichloro-5-trifluoromethyl-pyridine		410-340-5	69045-84-7	Xn; R20/22 Xi: R41 R43 N: R51-53	Xn; N R: 20/22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-159-00-1	4-[2-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-ethoxy]quinazoline		410-580-0	120928-09-8	T; R25 Xn; R20 N: R50-53	T; N R: 20-25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61		
613-160-00-7	(1S)-2-metil-2,5-diazodiciklo[2.2.1]heptan dihidrobromid		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	methyl 3-isocyanatosulfonyl-2-thiophene-carboxylate		410-550-7	79277-18-2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2-14-42/43-48/22 S: (2-)22-30-35-36/37		

Indeks št.	Kemijsko ime	Opombe, ki veljajo za snovi	Št. EC	Št. CAS	Razvrstitev	Označitev	Mejne koncentracije	Opombe, ki veljajo za priprave
615-023-00-7	metilni ester 2-(izocianatosulfonilmetil)benzojske kisline(alt.): metil 2-(izocianatosulfonilmetil)benzoat		410-900-9	83056-32-0	R10 R14 Muta. kat. 3; R40 Xn; R20-48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10-14-20-40-41-42-48/22 S: (2-23-26-36/37/39		
616-044-00-4	N-(3,5-dikloro-4-etil-2-hidroksifenil)-2-(3-pentadecilfenoksi)-butanamid		402-510-2	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-chloro-3-cyano-5-formyl-2-thienylazo)-5'-diethylamino-2-methoxyacetanilide		405-190-2	122371-93-1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-22-24-37-61		
616-046-00-5	N-(2-(6-kloro-7-metilpirazolo(1,5-b)-1,2,4-triazol-4-il)propil)-2-(2,4-di-terc-pentilfenoksi)oktanamid		406-390-2	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	A mixture of: 2,2', 2'', 2'''-(ethylenedinitrilotetrakis-N, N-di(C16)alkylacetamide: 2,2', 2'', 2'''-ethylenedinitrilotetrakis-N, N-di(C18)alkylacetamide		406-640-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-24-37		
616-048-00-6	3'-trifluorometilzobutiranilid		406-740-4	1939-27-1	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-22-36-61		
616-049-00-1	2-(2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenoksi)-N-(3,5-dikloro-4-etil-2-hidroksifenil)-heksanamid		408-150-2	99141-89-6	R53	R: 53 S: 61		
616-050-00-7	N-[2,5-dikloro-4-(1,1,2,3,3,3-heksafluoropropoksi)-fenil-aminokarbonil]-2,6-difluorobenzamid		410-690-9	103055-07-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-24-37-60-61		
616-051-00-2	zmes: 2,4-bis(N'-(4-metilfenil)-ureido)-toluena; 2,6-bis(N'-(4-metilfenil)-ureido)-toluena		411-070-0	—	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bis(4-metilbenzoi)peroksid		407-950-9	895-85-2	E; R2 O; R7 N; R50-53	E; N R: 2-7-50/53 S: (2-7-14-36/37/39-47-60-61		
650-032-00-X	ciprokonazol (ISO) (2 RS, 3 RS; 2 RS, 3 SR)-2-(4-klorofenil)-3-ciklopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol		—	94361-06-5	Repr. kat. 3; R63 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53-63 S: (2-36/37-60-61		

PRILOGA 2

Narava posebnih tveganj, pripisanih nevarnim snovem in pripravkom

Glej: Direktivo Komisije 2001/59/ES, UL L 225, 21.8.2001, str. 85.

PRILOGA 3A

Varnostni nasveti za nevarne snovi in pripravke

Glej: Direktivo Komisije 2001/59/ES, UL L 225, 21.8.2001, str. 123.

—

PRILOGA 3B

Varnostni nasveti za nevarne snovi in pripravke

Glej: Direktivo Komisije 2001/59/ES, UL L 225, 21.8.2001, str. 123.

—

PRILOGA 4A

„B.10. MUTAGENOST — PREIZKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ PRI SESALCIH IN VITRO**1. METODA**

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 473, *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test* (1997).

1.1 UVOD

Namen preizkusa kromosomskih aberacij *in vitro* je določiti snovi, ki povzročijo strukturne kromosomske aberacije v kultiviranih sesalskih celicah (1) (2) (3). Ločimo dva tipa strukturnih aberacij, kromosomski tip in kromatidni tip. Večina kemičnih mutagenov povzroči aberacije kromatidnega tipa, nastopajo pa tudi aberacije kromosomskega tipa. Povečanje poliploidije lahko pomeni, da kemikalija lahko povzroči numerične aberacije. Vendar ta metoda ni namenjena določanju numeričnih aberacij in se navadno ne uporablja v ta namen. Kromosomske mutacije in podobni pojavi so vzrok številnih genskih bolezni pri človeku in obstajajo tehtni dokazi, da so kromosomske mutacije in podobni pojavi, ki povzročajo spremembe v onkogenih in genih, zaviralcih rasti tumorjev, somatskih celic, povezani z nastankom raka pri človeku in poskusnih živalih.

Pri preizkusu kromosomskih aberacij *in vitro* se lahko uporabijo kulture trajnih celičnih linij, celični sevi ali primarne celične kulture. Uporabljene celice se izberejo na podlagi zmožnosti rasti v kulturi, stabilnosti kariotipa, kromosomskega števila, raznolikosti kromosomov in pogostnosti spontanah kromosomskih aberacij.

Za preizkuse, opravljene *in vitro*, so navadno potrebni zunanji viri aktivacije presnove. Takšen sistem aktivacije presnove ne more povsem posnemati razmer *in vivo* pri sesalcih. Treba je paziti, da se prepreči nastanek razmer, ki bi vodile do pozitivnih rezultatov, ki ne kažejo prave mutagenosti in so lahko posledica sprememb pH, osmolarnosti ali visoke ravni citotoksičnosti (4) (5).

Ta preizkus se uporablja za iskanje možnih mutagenov in rakotvornih snovi za sesalce. Mnoge spojine, pri katerih je rezultat tega preizkusa pozitiven, so rakotvorne snovi za sesalce; vendar pa soodvisnost med tem preizkusom in rakotvornostjo ni popolna. Odvisna je od skupine nevarnosti kemikalije in vedno več je dokazov, da obstajajo rakotvorne snovi, ki jih ta preizkus ne zazna, ker je videti, da delujejo prek drugih mehanizmov in ne z neposrednim poškodovanjem DNA.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posameznih kromatid ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Endoreduplikacija: proces, pri katerem se jedro po podvojitvi DNA v fazi S ne začne deliti, ampak takoj nastopi druga faza S. Nastanejo kromosomi s 4, 8, 16,... kromatidami.

Presledek: akromatska lezija, manjša od širine ene kromatide, ob zelo majhni nepravilnosti kromatid.

Mitotični indeks: razmerje med številom celic v metafazi in skupnim številom celic v opazovani populaciji celic; kazalec stopnje množitve te populacije.

Numerična aberacija: število kromosomov, drugačno od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene celice.

Poliploidija: večkratnik haploidnega števila kromosomov (n), razen diploidnega števila (tj. $3n$, $4n$ in tako naprej).

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki je vidna pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve v obliki delecij in fragmentov, transpozicij ali recipročnih translokacij.

1.3 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Celične kulture se izpostavijo preizkušani snovi ob aktivaciji presnove in brez nje. Celične kulture se v poprej določenih intervalih po izpostavitvi preizkušani snovi obdelajo s snovjo za ustavitev metafaze (npr. Colcemidom® ali kolhicinom), se požanjejo in obarvajo, nato se metafazne celice mikroskopsko pregledajo, da se določi navzočnost kromosomskih aberacij.

1.4 OPIS PREIZKUSNE METODE

1.4.1 Priprave

1.4.1.1 Celice

Lahko se uporabijo različne celične linije, celični sevi ali primarne celične kulture, vključno s človeškimi celicami (npr. fibroblasti kitajskega hrčka, limfociti periferne krvi človeka ali drugih sesalcev).

1.4.1.2 Gojišče in pogoji kultiviranja

Pri vzdrževanju kultur naj se uporabijo ustrezna gojišča za kulture in pogoji inkubacije (posode za kulture, koncentracija CO_2 , temperatura in vlažnost). Trajne celične linije in sevi se redno preverjajo, ali je v njih modalno kromosomsko število stabilno in ali niso okužene z mikoplazmo; okužene celične linije in sevi naj se ne uporabljajo. Poznati je treba normalni čas celičnega ciklusa in pogoje kultiviranja.

1.4.1.3 Priprava kultur

Trajne celične linije in sevi: celice se namnožijo iz založnih kultur, nasadijo v gojišče tako na gosto, da kultura ne bo dosegla konfluentne rasti, preden se požanjejo, in se inkubirajo pri 37°C .

Limfociti: celotna kri, obdelana z antikoagulantom (npr. heparinom), ali ločeni limfociti, dobljeni iz zdravih osebkov, se dodajo v gojišče, ki vsebuje mitogen (npr. fitohemaglutinin), in se inkubirajo pri 37°C .

1.4.1.4 Aktivacija presnove

Celice naj se izpostavijo preizkušani snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti ustreznega sistema za aktivacijo presnove. Najpogostejše uporabljani sistem je postmitohondrijska frakcija (S9), pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kakor je Aroclorm 1254 (6) (7) (8) (9), ali z zmesjo fenobarbitona in β – naftoflavona, z dodanimi kofaktorji (10) (11) (12).

Postmitohondrijska frakcija se navadno uporablja v koncentracijah 1-10 % v/v v končnem preizkusnem gojišču. Pogoji sistema za aktivacijo presnove so lahko odvisni od skupine nevarnosti preizkušane kemikalije. Včasih je primerno uporabiti več kakor eno koncentracijo postmitohondrijske frakcije.

Vrsta razvojnih dosežkov, skupaj s pridobivanjem gensko spremenjenih celičnih linij, v katerih se izražajo geni za točno določene aktivirajoče encime, lahko daje možnosti za endogeno aktivacijo. Izbira uporabljanih celičnih linij naj bo znanstveno utemeljena (npr. s pomembnostjo izoencima citokrom P450 za presnovo preizkušane snovi).

1.4.1.5 *Preizkušana snov/priprava*

Trdne preizkušane snovi naj se pred obdelavo celic raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko dodajo neposredno v preizkusni sistem in/ali pred obdelavo razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

1.4.2 **Preizkusni pogoji**

1.4.2.1 *Topilo/nosilec*

Topilo/nosilec naj ne vzbuja suma, da kemično reagira s preizkusno snovjo, in naj bo združljivo s preživetjem celic in delovanjem S9. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadarkoli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca. Kadar se preizkušajo v vodi nestabilne snovi, naj se uporabijo brezvodna organska topila. Voda se lahko odstrani z molekulskim sitom.

1.4.2.2 *Koncentracije izpostavljenosti*

Med merili, ki jih je treba upoštevati pri določanju najvišje koncentracije, so citotoksičnost, topnost v preizkušnem sistemu in spremembe v pH ali osmolarnosti.

Citotoksičnost naj se določi ob aktivaciji presnove in brez nje v glavnem poskusu z uporabo ustreznega kazalca celične neokrnjenosti in rasti, kakor so stopnja konfluentne rasti, število živih celic ali mitotični indeks. Lahko je koristno, če se citotoksičnost in topnost določita v poprejšnjem poskusu.

Uporabijo naj se vsaj tri koncentracije, ki jih je mogoče analizirati. Ob nastopu citotoksičnosti naj te koncentracije zajamejo območje od največje toksičnosti do majhne toksičnosti ali netoksičnosti; to bo navadno pomenilo, da razlika med koncentracijami ne bo smela biti večja od faktorja med 2 in $\sqrt{10}$. V času odvzema naj bo pri najvišji koncentraciji znatno zmanjšana stopnja konfluentne rasti, število celic ali mitotični indeks (vsi za več kakor 50 %). Mitotični indeks je le posredno merilo citotoksičnih/citostatskih učinkov in je odvisen od časa, ki je pretekel od obdelave. Vendar je mitotični indeks sprejemljiv za suspenzijske kulture, pri katerih so druge meritve toksičnosti lahko težavne in nepraktične. Informacije o dinamiki celičnega ciklusa, kakor je povprečni generacijski čas (AGT), se lahko uporabijo kot dodatne informacije. Vendar je AGT le povprečna vrednost, iz katere ni vedno razviden obstoj zapoznelih podpopulacij, in celo zelo majhno povečanje povprečnega generacijskega časa lahko pomeni znatno zapoznelost optimalnega števila aberacij.

Za sorazmerno necitotoksične snovi naj bo največja preizkusna koncentracija 5 μ l/ml, 5 mg/ml oziroma 0,01 M, tista, ki je najnižja.

Za sorazmerno netopne snovi, ki pri koncentracijah, nižjih od netopnih koncentracij, niso toksične, naj bo največji uporabljeni odmerek koncentracija nad mejo topnosti v končnem gojišču kulture ob koncu obdelave. Pri nekaterih primerih (npr. kadar se toksičnost pokaže le pri koncentracijah, višjih od netopne koncentracije) je priporočljivo preizkusiti več kakor eno koncentracijo z vidno oborino. Lahko je koristno oceniti topnost na začetku in na koncu obdelave, saj se topnost med izpostavitvijo v preizkusnem sistemu lahko spremeni zaradi navzočnosti celic, seruma S9 itn. Netopnost se lahko zazna s prostim očesom. Oborina ne sme vplivati na štetje.

1.4.2.3 *Negativni in pozitivni kontrolni vzorci*

V vsak poskus naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo ali nosilec) kontrolni vzorci, ob aktivaciji presnove in brez nje. Kadar se uporabi aktivacija presnove, mora biti kemikalija pozitivne kontrole tista, pri kateri je za mutageni odziv potrebna aktivacija.

V pozitivnih kontrolnih vzorcih naj se uporabi znani klastogen pri ravneh izpostavljenosti, pri katerih se pričakuje ponovljivo in zaznavno povečanje glede na ozadje, ki pokaže občutljivost preizkusnega sistema.

Koncentracije pozitivne kontrole naj se izberejo tako, da so učinki jasni, vendar ne razkrijejo takoj identitete kodiranih mikroskopskih preparatov. Primeri snovi pozitivne kontrole vključujejo:

Stanje aktivacije presnove	Snov	Št. CAS	Št. Eines
Ni zunanje aktivacije presnove	metil metansulfonat	66-27-3	200-625-0
	etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
	N-etil-N-nitrozosečnina	759-73-9	212-072-2
	mitomicin C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrokinolin-N-oksidi	56-57-5	200-281-1
Zunanja aktivacija presnove	benzo(a) piren	50-32-8	200-028-5
	ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
	ciklofosfamid monohidrat	6055-19-2	

Lahko se uporabijo druge ustrezne snovi pozitivne kontrole. Uporabijo naj se kemikalije pozitivne kontrole, ki sodijo v isto skupino nevarnosti kakor preizkušana kemikalija, kadar so na voljo.

Za vsak odvzem naj se pripravijo negativni kontrolni vzorci, ki jih sestavlja le topilo ali nosilec v obdelovalnem gojišču, obdelani na enak način kakor obdelovalne kulture. Uporabijo se tudi neobdelani kontrolni vzorci, razen če pretekli kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

1.4.3 Postopek

1.4.3.1 Obdelava s preizkušano snovjo

Množice se celice se obdelajo s preizkušano snovjo ob navzočnosti in ob odsotnosti sistema za aktivacijo presnove. Obdelava limfocitov naj se začne približno 48 ur po mitogeni stimulaciji.

- 1.4.3.2 Navadno se pri vsaki koncentraciji uporabita dve vzporedni kulture; uporaba dveh vzporednih kultur se močno priporoča pri negativnih/s topilom kontrolnih kulturah. Kadar se na podlagi preteklih podatkov lahko dokaže, da so razlike med dvema vzporednima kulturama minimalne (13) (14), je sprejemljivo, da se uporabi ena kultura za vsako koncentracijo.

Plinaste ali hlapne snovi naj se preizkušajo z ustreznimi metodami, na primer v zatesnjenih posodah za kulture (15) (16).

1.4.3.3 Čas odvzema celic iz kulture

V prvem poskusu naj se celice za 3-6 ur izpostavijo preizkušani snovi, ob aktivaciji presnove in brez nje, in vzorčijo v času približno 1,5 dolžine normalnega celičnega ciklusa po začetku obdelave (12). Če so pri takšnem protokolu rezultati negativni ob aktivaciji, pa tudi brez nje, se opravi dodatni poskus brez aktivacije, pri katerem se kultura nenehno obdeluje do vzorčenja v času, enakem približno 1,5 dolžine normalnega celičnega ciklusa. Nekatere kemikalije se lažje zaznajo pri časih obdelave/vzorčenja, ki so daljši od 1,5 dolžine ciklusa. Negativne rezultate ob aktivaciji presnove je treba potrditi za vsak primer posebej. Kadar se pojmuje, da potrditev negativnih rezultatov ni potrebna, naj se to utemelji.

1.4.3.4 Priprava kromosomov

Celične kulture se obdelajo s Colcemidom® ali kolhicinom, navadno 1-3 ure pred odvzemom celic. Celice se odvzamejo in obdelajo za pripravo kromosomov iz vsake kulture posebej. Priprava kromosomov vključuje hipotonično obdelavo celic, fiksiranje in barvanje.

1.4.3.5 Analiza

Vsi preparati, skupaj s pozitivnimi in negativnimi kontrolnimi vzorci, naj se pred mikroskopsko analizo neodvisno kodirajo. Ker fiksiranje pogosto povzroči pretrganje dela metafaznih celic in izgubo kromosomov, naj bo število centromerov v štetih celicah pri vseh vrstah celic enako modalnemu številu ± 2 . Če je to primerno, naj se na vsako koncentracijo in vsak kontrolni vzorec v štetje vključi vsaj 200 dobro vidnih metafaz, ki so enakomerno porazdeljene med vzporedne vzorce. To število se lahko zmanjša, kadar se opazi veliko število aberacij.

Čeprav je namen preizkusa zaznati strukturne kromosomske aberacije, je pomembno, da se evidentirata poliploidija in endoreduplikacija, kadar se pokažeta.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Poskusna enota je celica, zato naj se določi odstotek celic z eno ali več strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Različni tipi strukturnih kromosomskih aberacij naj se navedejo skupaj s števili in pogostnostjo za poskusne in kontrolne kulture. Presledki se evidentirajo ločeno in navedejo v poročilu, vendar se na splošno ne vključijo v skupno pogostnost aberacij.

Evidentirajo naj se tudi sočasne meritve citotoksičnosti za vse obdelane in negativne kontrolne kulture v glavnih poskusih aberacij.

Navedejo se podatki za posamezne kulture. Vsi podatki naj bodo povzeti v tabelah.

Preverjanje jasnega pozitivnega odziva ni potrebno. Dvoumni rezultati naj se razjasnijo z dodatnimi preizkusi, po možnosti ob prilagojenih poskusnih pogojih. Potrebno potrditve negativnih rezultatov je obravnavana pod 1.4.3.3. V nadaljnjih poskusih naj se preuči možnost prilagoditve preizkusnih parametrov, da se razširi območje pogojev analize. Preizkusni parametri, ki bi se lahko prilagodili, vključujejo intervale med koncentracijami in pogoje aktivacije presnove.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kakor je na primer s koncentracijo povezano povečanje ali ponovljivo povečanje števila celic s kromosomskimi aberacijami. Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode (3) (13). Statistična značilnost naj ne bo edini odločilni dejavnik za pozitiven odziv.

Povečano število poliploidnih celic lahko pomeni, da preizkušana snov lahko zavre mitozo in povzroči numerične kromosomske aberacije. Povečano število celic z endoredupliciranimi kromosomi lahko pomeni, da preizkušana snov lahko zavre potek celičnega ciklusa (17) (18).

Pojmuje se, da preizkušana snov, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril, ni mutagena v tem sistemu.

Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvoumni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultati preizkusa kromosomskih aberacij *in vitro* pomenijo, da preizkušana snov povzroča strukturne kromosomske aberacije v kultiviranih somatskih celicah sesalcev. Negativni rezultati pomenijo, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ne povzroča kromosomskih aberacij v kultiviranih somatskih celicah sesalcev.

3. POROČANJE

POROČILO O PREIZKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

- utemeljitev izbire nosilca,
- topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Celice:

- vrsta in vir celic,
- značilnosti kariotipa in ustreznost uporabljene vrste celic,
- odsotnost mikoplazme, če je to primerno,
- podatki o dolžini celičnega ciklusa,
- spol donorjev krvi, celotna kri ali ločeni limfociti, uporabljeni mitogen,
- število pasaž, če je to primerno,
- metode vzdrževanja celične kulture, če je to primerno,
- modalno število kromosomov.

Preizkusni pogoji:

- vrsta snovi za ustavitev metafaze, njena koncentracija in čas izpostavljenosti celic,
- razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, vključno z npr. podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti, če so na voljo,
- sestava gojišč, koncentracija CO₂, če je to primerno,
- koncentracija preizkušane snovi,
- volumen dodanega nosilca in preizkušane snovi,
- temperatura inkubacije,
- čas inkubacije,
- trajanje obdelave,
- gostota celic ob nasaditvi, če je to primerno,
- vrsta in sestava sistema za aktivacijo presnove, skupaj z merili sprejemljivosti,
- pozitivni in negativni kontrolni vzorci,
- metode priprave mikroskopskih preparatov,
- merila za štetje aberacij,

- število analiziranih metafaz,
- metode merjenja toksičnosti,
- merila za določitev, ali je študija pozitivna, negativna ali dvoumna.

Rezultati:

- znaki toksičnosti, npr. stopnja konfluentne rasti, podatki o celičnem ciklusu, število celic, mitotični indeks,
- znaki obarjanja,
- podatki o pH in osmolarnosti obdelovalnega gojišča, če sta bila določena,
- opredelitev aberacij, skupaj s presledki,
- število celic s kromosomskimi aberacijami in tip kromosomskih aberacij, ki se navedeta posebej za vsako obdelano in kontrolno kulturo,
- spremembe v ploidnosti, če so bile opažene,
- odvisnost med odmerkom in odzivom, kadar je to mogoče,
- statistične analize, če so bile opravljene,
- podatki o sočasni negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli,
- podatki o pretekli negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. LITERATURA

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

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

PRILOGA 4B

„B.11. MUTAGENOST — PREIZKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V KOSTNEM MOZGU SESALCEV IN VIVO**1. METODA**

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 UVOD

Preizkus kromosomskih aberacij *in vivo* pri sesalcih se uporablja za odkrivanje strukturnih kromosomskih aberacij, ki jih povzroči preizkušana snov v celicah kostnega mozga živali, navadno glodavcev (1) (2) (3) (4). Ločimo dva tipa strukturnih kromosomskih aberacij, kromosomski tip in kromatidni tip. Povečanje poliploidije lahko pomeni, da kemikalija lahko povzroči numerične aberacije. Večina kemičnih mutagenov povzroči aberacije kromatidnega tipa, nastopajo pa tudi aberacije kromosomskega tipa. Kromosomske mutacije in podobni pojavi so vzrok genskih bolezni pri človeku in obstajajo tehtni dokazi, da so kromosomske mutacije in podobni pojavi, ki povzročajo spremembe v onkogenih in genih, zaviralcih rasti tumorjev, povezani z rakom pri človeku in v poskusnih sistemih.

Pri tem preizkusu se redno uporabljajo glodavci. Tarčno tkivo pri tem preizkusu je kostni mozeg, ker je zelo vaskularizirano tkivo in vsebuje populacijo celic s hitro menjavo ciklusa, ki se z lahkoto izolirajo in obdelajo. Druge vrste in tarčna tkiva niso predmet te metode.

Ta preizkus kromosomskih aberacij je posebno primeren za ocenjevanje nevarnosti mutagenosti, ker omogoča upoštevanje dejavnikov presnove *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNA, čeprav so ti lahko različni pri različnih vrstah in tkivih. Preizkus *in vivo* je koristen tudi za nadaljnjo preiskavo mutagenih učinkov, odkritih pri preizkusu *in vitro*.

Če obstajajo dokazi, da preizkušana snov ali reaktivni metabolit ne bo dosegel tarčnega tkiva, ta preizkus ni primeren.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posameznih kromatid ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev pri obeh kromatidih na istem mestu.

Endoreduplikacija: proces, pri katerem se jedro po podvojitvi DNA v fazi S ne začne deliti, ampak takoj nastopi druga faza S. Nastanejo kromosomi s 4, 8, 16,... kromatidami.

Presledek: akromatska lezija, manjša od širine ene kromatide, ob zelo majhni nepravilnosti kromatid(-e).

Numerična aberacija: število kromosomov, drugačno od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene celice.

Poliploidija: večkratnik haploidnega števila kromosomov (n), razen diploidnega števila (tj. $3n$, $4n$ in tako naprej).

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki je vidna pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve v obliki delecij in fragmentov, transpozicij ali recipročnih translokacij.

1.3 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Živali se primerno izpostavijo preizkušani snovi in se v primernem času po tretiranju žrtvujejo. Pred žrtvovanjem se živali tretirajo s sredstvom za ustavitev metafaze (npr. kolhicinom ali Colcemidom®). Nato se pripravijo in obarvajo preparati kromosomov iz celic kostnega mozga in se določijo kromosomske aberacije v metafaznih celicah.

1.4 OPIS PREIZKUSNE METODE

1.4.1 Priprave

1.4.1.1 Izbor živalske vrste

Navadno se uporabljajo podgane, miši in kitajski hrčki, lahko pa se uporabi katera koli primerna vrsta sesalcev. Uporabijo naj se splošno uporabljani laboratorijski sevi mladih zdravih odraslih živali. Ob začetku študije naj bo nihanje teže živali čim manjše in naj ne presega $\pm 20\%$ srednje vrednosti teže vsakega spola.

1.4.1.2 Pogoji bivanja in hranjenja

Uporabljajo se splošni pogoji iz splošnega uvoda dela B, vendar naj bo ciljna vlažnost 50-60 %.

1.4.1.3 Priprava živali

Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Kletke se razporedijo tako, da se čimbolj zmanjšajo možni učinki postavitve kletke. Živali se označijo z enkratnimi oznakami. Živali se vsaj pet dni aklimatizirajo na laboratorijske razmere.

1.4.1.4 Priprava odmerkov

Trdne preizkušane snovi naj se pred odmerjanjem živalim raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

1.4.2 Preizkusni pogoji

1.4.2.1 Topilo/nosilec

Topilo/nosilec naj nima toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in naj se zanj ne sumi, da kemično reagira s preizkusno snovjo. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadarkoli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca.

1.4.2.2 Kontrolni vzorci

V vsak preizkus naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo/nosilec) kontrolni vzorci za vsak spol. Razen tretiranja s preizkusno snovjo naj se z živalmi v kontrolnih skupinah ravna enako kakor s tistimi v tretiranih skupinah.

Snovi pozitivne kontrole naj pri ravneh izpostavljenosti, pri katerih se pričakuje zaznavno povečanje glede na ozadje, povzročijo kromosomske aberacije *in vivo*. Odmerki pozitivne kontrole naj se izberejo tako, da so učinki jasni, vendar ne razkrijejo takoj identitete kodiranih mikroskopskih preparatov. Sprejemljivo je, da se snovi pozitivne kontrole dajejo živalim drugače kakor preizkušana snov in da se pri pozitivni

kontroli vzorči le enkrat. Lahko se uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki sodijo v isti razred kakor preizkušana kemikalija, kadar so na voljo.
Primeri snovi pozitivne kontrole vključujejo:

Snov	Št. CAS	Št. Eines
etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrozo-sečnina	759-73-9	212-072-2
mitomicin C	50-07-7	200-008-6
ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
ciklofosfamid monohidrat	6055-19-2	
trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativni kontrolni vzorci, tretirani le s topilom ali nosilcem, drugače pa obravnavani enako kakor tretirane skupine, naj se vključijo v vsako vzorčenje, razen če pretekli kontrolni podatki kažejo na sprejemljivo spremenljivost med posameznimi živalmi in pogostnost celic s kromosomskimi aberacijami. Če se pri negativni kontroli opravi le eno vzorčenje, je čas prvega vzorčenja najprimernejši. Uporabijo naj se tudi netretirani kontrolni vzorci, razen če pretekli ali objavljeni kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo/nosilec ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 Število in spol živali

Vsaka tretirana in kontrolna skupina mora vključevati vsaj pet živali vsakega spola, ki jih je mogoče analizirati. Če so v času študije na voljo podatki študij o isti vrsti in ob uporabi istega načina izpostavljanja, ki dokazujejo, da med spoloma ni znatnih razlik v toksičnosti, bo zadostovalo preizkušanje na enem spolu. Kadar bi bila izpostavljenost kemikaliji pri človeku lahko omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmaceutskih učinkovinah, naj se preizkus opravi na živalih ustreznega spola.

1.5.2 Program tretiranja

Preizkušane snovi naj se po možnosti dajo z enkratnim vnosom. Preizkušane snovi se lahko dajejo tudi v razdeljenem odmerku, to pomeni dva vnosa v istem dnevu, ne več kakor nekaj ur narazen, da se olajša dajanje velikega volumna materiala. Drugačni režimi odmerjanja naj bodo znanstveno utemeljeni.

Vzorci naj se vzamejo dvakrat v enem dnevu ob različnih časih po tretiranju. Pri glodavcih je prvi čas vzorčenja 1,5 dolžine normalnega celičnega ciklusa (ki navadno traja 12-18 ur) po tretiranju. Ker čas, potreben za sprejem in presnovo preizkušane snovi ter njen učinek na dinamiko celičnega ciklusa, lahko vpliva na optimalni čas za zaznavo kromosomskih aberacij, se priporoča ponovni odvzem vzorcev 24 ur po prvem vzorčenju. Če se uporabijo režimi odmerjanja, daljši od enega dneva, naj se vzorči enkrat, 1,5 dolžine normalnega celičnega ciklusa po zadnjem vnosu.

Pred žrtvovanjem se živalim intraperitonealno injicira ustrezen odmerek sredstva za ustavitev metafaze (npr. Colcemida® ali kolhicina). Živali se vzorčijo v ustreznem časovnem intervalu po tem. Pri miših je ta interval približno 3-5 ur; pri kitajskih hrčkah je ta interval približno 4-5 ur. Celice se odvzamejo iz kostnega mozga in analizirajo, da se določijo kromosomske aberacije.

1.5.3 Velikost odmerkov

Če se opravi študija za ugotavljanje območja, ker ni na voljo ustreznih podatkov, naj se opravi v istem laboratoriju, na isti vrsti, sevu in spolu ter ob enakem režimu tretiranja, kakor bo to uporabljeno v glavni študiji (5). Če toksičnost je, se za prvo vzorčenje uporabijo tri velikosti odmerkov. Te velikosti odmerkov naj zajamejo območje od največje toksičnosti do majhne toksičnosti ali netoksičnosti. Pri poznejšem vzorčenju se lahko uporabi le največji odmerek. Največji odmerek je opredeljen kot odmerek, ki povzroči takšne znake toksičnosti, na podlagi katerih je pričakovati, da bi večji odmerki pri istem režimu odmerjanja povzročili smrt. Snovi s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih netoksičnih odmerkih (na primer hormoni in mitogeni) so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerka in naj se ovrednotijo za vsak primer posebej. Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v kostnem mozgu (npr. več kakor 50 % zmanjšanje mitotičnega indeksa).

1.5.4 Mejni preizkus

Če preizkus pri eni velikosti odmerka vsaj 2 000 mg/kg telesne teže, ki se dá v enem vnosu ali v dveh vnosih v istem dnevu, ne povzroči nobenih opaznih toksičnih učinkov in če se na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh ne pričakuje, da bo snov genotoksična, se lahko pojmuje, da popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov ni potrebna. Mejni odmerek za dolgotrajnejše študije je 2 000 mg/kg telesne teže/dan za tretiranje do 14 dni in 1 000 mg/kg telesne teže/dan za tretiranje, daljše od 14 dni. Pričakovana izpostavljenost človeka lahko nakaže potrebo po večjih odmerkih pri mejnem preizkusu.

1.5.5 Dajanje odmerkov

Navadno se preizkušana snov daje z gavažo po želodčni cevki ali ustrezni intubacijski kanili ali z intraperitonealno injekcijo. Sprejemljivi so tudi drugi načini izpostavljanja, kadar jih je mogoče utemeljiti. Največji volumen tekočine, ki se lahko naenkrat dá z gavažo ali injekcijo, je odvisen od velikosti preizkušane živali. Volumen naj ne presega 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih volumnov je treba utemeljiti. Razen pri dražjih ali jedkih snoveh, ki bodo navadno povzročile dražilne učinke pri večjih koncentracijah, naj se s prilagoditvijo koncentracije čimbolj zmanjša spremenljivost preizkušane volumna, tako da se zagotovi stalni volumen pri vseh velikostih odmerkov.

1.5.6 Priprava kromosomov

Takoj po žrtvovanju se kostni mozeg odvzame, izpostavi hipotonični raztopini in fiksira. Celice se nato nanesejo na objektna stekla in obarvajo.

1.5.7 Analiza

Kot merilo citotoksičnosti naj se določi mitotični indeks v vsaj 1 000 celicah na žival pri vseh tretiranih živalih (skupaj s pozitivnimi kontrolnimi vzorci) in netretiranih živalih negativne kontrole.

Analizira naj se vsaj 100 celic za vsako žival. To število se lahko zmanjša, kadar se opazi veliko število aberacij. Vsi preparati, skupaj s pozitivnimi in negativnimi kontrolnimi vzorci, naj se pred mikroskopsko analizo neodvisno kodirajo. Ker postopki priprave mikroskopskih preparatov pogosto povzročijo pretrganje dela metafaz in izgubo kromosomov, naj bo število centromerov v štetih celicah enako $2n \pm 2$.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki za posamezne živali naj bodo prikazani v tabelah. Poskusna enota je žival. Za vsako žival naj se določi število štetih celic, število aberacij na celico in odstotek celic z eno ali več strukturnimi kromosomskimi aberacijami. Različni tipi strukturnih kromosomskih aberacij naj se navedejo skupaj s števili in pogostnostjo za tretirane in kontrolne skupine. Presledki se evidentirajo ločeno in navedejo v poročilu, vendar se na splošno ne vključijo v skupno pogostnost aberacij. Če ni dokaza za razliko v odzivu med spoloma, se pri statistični analizi lahko združijo podatki za oba spola.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kakor je na primer z odmerkom povezano povečanje relativnega števila celic s kromosomskimi aberacijami ali jasno povečanje števila celic z aberacijami v posamezni tretirani skupini ob posameznem vzorčenju. Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode (6). Statistična značilnost naj ne bo edini odločilni dejavnik za pozitiven odziv. Dvourni rezultati naj se razjasnijo z dodatnimi preizkusi, po možnosti ob prilagojenih poskusnih pogojih.

Povečanje poliploidije lahko pomeni, da preizkušana snov lahko povzroči numerične kromosomske aberacije. Povečanje pogostnosti endoreduplikacije lahko pomeni, da preizkušana snov lahko zavre potek celičnega ciklusa (7) (8).

Pojmuje se, da preizkušana snov, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril, ni mutagena v tem preizkusu.

Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvourni ali dvomljivi ne glede na število opravljenih poskusov.

Pozitivni rezultati preizkusa kromosomskih aberacij *in vivo* pomenijo, da preizkušana snov povzroča kromosomske aberacije v kostnem mozgu preizkušane vrste. Negativni rezultati pomenijo, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ne povzroča kromosomskih aberacij v kostnem mozgu preizkušane vrste.

Obravnava naj se verjetnost, da preizkušana snov ali njeni metaboliti dosežejo krvni obtok ali posebej tarčno tkivo (npr. sistemska toksičnost).

3. POROČANJE

POROČILO O PREIZKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

- utemeljitev izbire nosilca,
- topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Preizkusne živali:

- uporabljena vrsta/sev,
- število, starost in spol živali,
- vir, pogoji bivanja, prehrana itn.,
- teža posameznih živali na začetku preizkusa, skupaj z območjem telesne teže, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom za vsako skupino.

Preizkusni pogoji:

- pozitivni in negativni (nosilec/topilo) kontrolni vzorci,
- podatki študije za ugotavljanje območja, če je bila opravljena,
- razlogi za izbiro velikosti odmerka,
- podrobnosti o pripravi preizkušane snovi,

- podrobnosti o dajanju preizkušane snovi,
- razlogi za način dajanja,
- metode za preverjanje, ali je preizkušana snov dosegla krvni obtok ali tarčno tkivo, če je to primerno,
- način preračunavanja koncentracije preizkušane snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je to primerno,
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode,
- podroben opis programov tretiranja in vzorčenja,
- metode merjenja toksičnosti,
- vrsta snovi za ustavitev metafaze, njena koncentracija in čas tretiranja,
- metode priprave mikroskopskih preparatov,
- merila za štetje aberacij,
- število analiziranih celic na žival,
- merila za določitev, ali je študija pozitivna, negativna ali dvoumna.

Rezultati:

- znaki toksičnosti,
- mitotični indeks,
- tip in število aberacij, navedena za vsako žival posebej,
- skupno število aberacij na skupino, s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,
- število celic z aberacijami na skupino, s srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,
- spremembe v ploidnosti, če so bile opažene,
- odvisnost med odmerkom in odzivom, kadar je to mogoče,
- statistične analize, če so bile opravljene,
- podatki o sočasni negativni kontroli,
- podatki o pretekli negativni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,
- podatki o sočasni pozitivni kontroli.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. LITERATURA

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

- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J., in Henderson, L. (1990), *In Vivo Cytogenetic Assays*, v: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Poročilo, del I, pregledan*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 115-141.
 - (4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., in Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, str. 305-312.
 - (5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, str. 313-319.
 - (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G., in Savage, J. R. K. (1989), *Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays*, v: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, *Poročilo, del III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (izd.) Cambridge University Press, Cambridge, str. 184-232.
 - (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, str. 403-413.
 - (8) Huang, Y., Change, C., in Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, str. 1362-1364.
-

PRILOGA 4C

„B.12. MUTAGENOST — PREIZKUS MIKRONUKLEUSOV V ERITROCITIH SESALCEV IN VIVO

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1 UVOD

Preizkus mikronukleusov *in vivo* pri sesalcih se uporablja za odkrivanje poškodb, ki jih preizkušana snov povzroči na kromosomih ali mitotičnem aparatu eritroblastov, z analizo eritrocitov, vzorčenih iz kostnega mozga in/ali celic periferne krvi živali, navadno glodavcev.

Namen preizkusa mikronukleusov je določiti snovi, povzročiteljice citogenetskih poškodb, zaradi katerih nastanejo mikronukleusi, ki vsebujejo zaostale fragmente kromosomov ali cele kromosome.

Ko se eritroblast iz kostnega mozga razvije v polikromatični eritrocit, se jedro izvrže; kakršenkoli mikronukleus, ki je nastal, lahko ostane v drugače brezjedrni citoplazmi. Vidnost mikronukleusov je v teh celicah olajšana, ker nimajo jedra. Povečanje pogostnosti polikromatičnih eritrocitov z mikronukleusi pri tretiranih živalih je znak induciranih poškodb kromosomov.

Pri tem preizkusu se redno uporablja kostni mozeg glodavcev, saj v tem tkivu nastajajo polikromatični eritrociti. Določanje nezrelih (polikromatičnih) eritrocitov z mikronukleusi v periferni krvi je enako sprejemljivo pri katerikoli vrsti, pri kateri je bilo dokazano, da vranica ni zmožna odstraniti eritrocitov z mikronukleusi, ali ki je pokazala dovoljšno občutljivost za zaznavanje snovi, povzročajočih strukturne ali numerične kromosomske aberacije. Mikronukleusi se lahko razločijo na podlagi številnih meril. Ta vključujejo določanje navzočnosti ali odsotnosti kinetohora ali centromerne DNA v mikronukleusih. Pogostnost nezrelih (polikromatičnih) eritrocitov z mikronukleusi je glavna končna točka. Število zrelih (normokromatičnih) eritrocitov, ki vsebujejo mikronukleuse, v periferni krvi med določenim številom zrelih eritrocitov se tudi lahko uporabi kot končna točka preizkusa, kadar se živali tretirajo štiri tedne ali več.

Ta preizkus mikronukleusov *in vivo* pri sesalcih je posebno primeren za ocenjevanje nevarnosti mutagenosti, ker omogoča upoštevanje dejavnikov presnove *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNA, čeprav so ti lahko različni pri različnih vrstah, tkivih in genetskih končnih točkah. Preizkus *in vivo* je koristen tudi za nadaljnjo preiskavo mutagenih učinkov, odkritih v sistemu *in vitro*.

Če obstajajo dokazi, da preizkušana snov ali reaktivni metabolit ne bo dosegel tarčnega tkiva, ta preizkus ni primeren.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Centromera (kinetohor): del(-i) kromosoma, s katerim(-i) se med celično delitvijo povežejo niti delitvenega vretena, kar omogoči urejeno gibanje hčerinskih kromosomov proti poloma hčerinskih celic.

Mikronukleusi: majhna jedra, poleg glavnega jedra celic in ločena od njega, ki nastanejo med telofazo mitoze (mejoze) iz zaostalih fragmentov kromosomov ali celih kromosomov.

Normokromatični eritrocit: zreli eritrocit, ki nima ribosomov in ga lahko ločimo od nezrelih, polikromatičnih eritrocitov z barvanjem, selektivnim za ribosome.

Polikromatični eritrocit: nezreli eritrocit, v vmesnem stadiju razvoja, ki še vedno vsebuje ribosome in ga zato lahko ločimo od zrelih, normokromatičnih eritrocitov z barvanjem, selektivnim za ribosome.

1.3 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Živali se primerno izpostavijo preizkušani snovi. Če se uporabi kostni mozeg, se živali žrtvujejo ob primernih časih po tretiranju, nato se odvzame kostni mozeg ter se pripravijo in obarvajo preparati (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Kadar se uporabi periferna kri, se kri odvzame ob primernih časih po tretiranju, nato se pripravijo in obarvajo razmazi krvi (4) (8) (9) (10). Pri študijah s periferno krvjo naj med zadnjo izpostavitvijo in odvzemom celic preteče čimmanj časa. Preparati se analizirajo, da se določi navzočnost mikronukleusov.

1.4 OPIS PREIZKUSNE METODE

1.4.1 Priprave

1.4.1.1 Izbor živalske vrste

Če se uporabi kostni mozeg, se priporočajo miši ali podgane, lahko pa se uporabi katera koli primerna vrsta sesalcev. Kadar se uporabi periferna kri, se priporočajo miši. Lahko pa se uporabi katera koli primerna vrsta sesalcev, pri kateri vranica ne odstrani eritrocitov z mikronukleusi ali ki je pokazala dovoljšno občutljivost za zaznavanje snovi, povzročajočih strukturne ali numerične kromosomske aberacije. Uporabijo naj se splošno uporabljani laboratorijski sevi mladih zdravih živali. Ob začetku študije naj bo nihanje teže živali čim manjše in naj ne presega $\pm 20\%$ srednje vrednosti teže vsakega spola.

1.4.1.2 Pogoji bivanja in hranjenja

Uporabljajo se splošni pogoji iz splošnega uvoda dela B, vendar naj bo ciljna vlažnost 50-60 %.

1.4.1.3 Priprava živali

Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Živali se označijo z enkratnimi oznakami. Živali se vsaj pet dni aklimatizirajo na laboratorijske razmere. Kletke se razporedijo tako, da se čimbolj zmanjšajo možni učinki postavitve kletke.

1.4.1.4 Priprava odmerkov

Trdne preizkušane snovi naj se pred odmerjanjem živalim raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

1.4.2 Preizkusni pogoji

1.4.2.1 Topilo/nosilec

Topilo/nosilec naj nima toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in naj se zanj ne sumi, da kemično reagira s preizkušano snovjo. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo referenčni podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da je, kadarkoli je to mogoče, prva izbira vodno topilo/nosilec.

1.4.2.2 Kontrolni vzorci

V vsak preizkus naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo/nosilec) kontrolni vzorci za vsak spol. Razen tretiranja s preizkušano snovjo naj se z živalmi v kontrolnih skupinah ravna enako kakor s tistimi v tretiranih skupinah.

Snovi pozitivne kontrole naj pri ravneh izpostavljenosti, pri katerih se pričakuje zaznavno povečanje glede na ozadje, povzročijo nastanek mikronukleusov *in vivo*. Odmerki pozitivne kontrole naj se izberejo tako, da so učinki jasni, vendar ne razkrijejo takoj identitete kodiranih mikroskopskih preparatov. Sprejemljivo je, da se snovi pozitivne kontrole dajejo živalim drugače kakor preizkušana snov in da se pri pozitivni kontroli vzorči le enkrat. Poleg tega se lahko uporabijo kemikalije pozitivne kontrole, ki sodijo v isto skupino nevarnosti kakor preizkušana kemikalija, kadar so na voljo. Primeri snovi pozitivne kontrole vključujejo:

Snov	Št. CAS	Št. EINECS
etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrozosečnina	759-73-9	212-072-2
mitomicin C	50-07-7	200-008-6
ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
ciklofosfamid monohidrat	6055-19-2	
trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativni kontrolni vzorci, tretirani le s topilom ali nosilcem, drugače pa obravnavani enako kakor tretirane skupine, naj se vključijo v vsako vzorčenje, razen če pretekli kontrolni podatki dokazujejo sprejemljivo spremenljivost med posameznimi živalmi in pogostnost celic z mikronukleusi. Če se pri negativni kontroli opravi le eno vzorčenje, je čas prvega vzorčenja najprimernejši. Uporabijo naj se tudi netretirani kontrolni vzorci, razen če pretekli ali objavljeni kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo/nosilec ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

Če se uporabi periferna kri, je kot negativni kontrolni vzorec lahko sprejemljiv tudi vzorec pred tretiranjem, vendar le pri kratkotrajnih študijah periferne krvi (npr. 1-3 tretiranje(-a)), kadar so dobljeni podatki v pričakovanem območju glede na preteklo kontrolo.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 Število in spol živali

Vsaka tretirana in kontrolna skupina mora vključevati vsaj pet živali vsakega spola, ki jih je mogoče analizirati (11). Če so v času študije na voljo podatki študij o isti vrsti in ob uporabi istega načina izpostavljanja, ki dokazujejo, da med spoloma ni znatnih razlik v toksičnosti, bo zadostovalo preizkušanje na enem spolu. Kadar bi bila lahko izpostavljenost kemikaliji pri človeku omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih učinkovinah, naj se preizkus opravi na živalih ustreznega spola.

1.5.2 Program tretiranja

Ni mogoče priporočiti nobenega standardnega programa tretiranja (to je enega, dveh ali več vnosov v 24-urnih intervalih). Vzorci iz dolgotrajnih režimov odmerjanja so sprejemljivi, pod pogojem, da je bil dokazan pozitiven učinek pri tej študiji ali pri negativni študiji, če je bila dokazana toksičnost ali je bil uporabljen mejni odmerek in se je odmerjanje nadaljevalo do vzorčenja. Preizkušane snovi se lahko dajejo tudi v razdeljenem odmerku, to pomeni dva vnosa v istem dnevu, ne več kakor nekaj ur narazen, da se olajša dajanje velikega volumna materiala.

Preizkus se lahko izvede na dva načina:

- živali se s snovjo tretirajo enkrat. Vzorci kostnega mozga se odvzamejo vsaj dvakrat, vsaj 24 ur po tretiranju in najpozneje 48 ur po tretiranju, z ustreznimi intervali med vzorčenji. Vzorčenje manj kakor 24 ur po tretiranju naj se utemelji. Vzorci periferne krvi se odvzamejo vsaj dvakrat, vsaj 36 ur po

tretiranju in najpozneje 72 ur po tretiranju, z ustreznimi intervali med vzorčenji. Ko se pri posameznem vzorčenju opazi pozitiven odziv, dodatno vzorčenje ni potrebno;

- (b) če se opravi dva dnevna vnosa ali več (npr. dva vnosa ali več v 24-urnih intervalih), se vzorci odvzamejo enkrat med 18. in 24. uro po zadnjem vnosu pri kostnem mozgu in enkrat med 36. in 48. uro po zadnjem vnosu pri periferni krvi (12).

Lahko se vzamejo dodatni vzorci ob drugih časih, kadar je to primerno.

1.5.3 Velikost odmerkov

Če se opravi študija za ugotavljanje območja, ker ni na voljo ustreznih podatkov, naj se opravi v istem laboratoriju, na isti vrsti, sevu in spolu ob enakem režimu tretiranja, kakor bo to uporabljeno v glavni študiji (13). Če toksičnost je, se za prvo vzorčenje uporabijo tri velikosti odmerkov. Te velikosti odmerkov naj zajamejo območje od največje toksičnosti do majhne toksičnosti ali netoksičnosti. Pri poznejšem vzorčenju se lahko uporabi le največji odmerek. Največji odmerek je opredeljen kot odmerek, ki povzroči takšne znake toksičnosti, na podlagi katerih je pričakovati, da bi večji odmerki pri istem režimu odmerjanja povzročili smrt. Snovi s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih netoksičnih odmerkih (na primer hormoni in mitogeni) so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerka in naj se ovrednotijo za vsak primer posebej. Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v kostnem mozgu (npr. zmanjšanje deleža nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti v kostnem mozgu ali periferni krvi).

1.5.4 Mejni preizkus

Če preizkus pri eni velikosti odmerka vsaj 2 000 mg/kg telesne teže, ki se dá v enem vnosu ali dveh vnosih v istem dnevu, ne povzroči nobenih opaznih toksičnih učinkov in če se na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh ne pričakuje, da bo snov genotoksična, se lahko pojmuje, da popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov ni potrebna. Mejni odmerek za dolgotrajnejše študije je 2 000 mg/kg telesne teže/dan za tretiranje do 14 dni in 1 000 mg/kg telesne teže/dan za tretiranje, daljše od 14 dni. Pričakovana izpostavljenost človeka lahko nakaže potrebo po večjih odmerkih pri mejnem preizkusu.

1.5.5 Dajanje odmerkov

Navadno se preizkušana snov daje z gavažo po želodčni cevki ali ustrezni intubacijski kanili ali z intraperitonealno injekcijo. Sprejemljivi so tudi drugi načini izpostavljanja, kadar se lahko utemeljijo. Največji volumen tekočine, ki se lahko naenkrat dá z gavažo ali injekcijo, je odvisen od velikosti preizkusne živali. Volumen naj ne presega 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih volumnov je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih snoveh, ki bodo pri večjih koncentracijah navadno povzročile dražilne učinke, naj se s prilagoditvijo koncentracije čimbolj zmanjša spremenljivost preizkusnega volumna, tako da se zagotovi stalni volumen pri vseh velikostih odmerkov.

1.5.6 Priprava kostnega mozga/krv

Celice kostnega mozga se navadno odvzamejo iz stegnenic ali golenic takoj po žrtvovanju. Navadno se celice odstranijo iz stegnenic ali golenic, se preparirajo in obarvajo z uporabo uveljavljenih metod. Periferna kri se odvzame iz repne vene ali druge primerne krvne žile. Krvne celice se takoj supravitalno obarvajo (8) (9) (10) ali pa se pripravijo razmazi, ki se nato obarvajo. Uporaba DNA-specifičnega barvila (npr. akridin oranž (14) ali Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)) lahko prepreči nastanek nekaterih artefaktov, povezanih z uporabo barvila, ki ni specifično za DNA. Ta prednost ne preprečuje uporabe splošno uporabljenih barvil (npr. Giemsa). Lahko se uporabijo tudi dodatni sistemi (npr. celulozne kolone za odstranitev celic z jedri (16)), pod pogojem, da je bilo dokazano, da ti sistemi zadovoljivo delujejo pri pripravi mikronukleusov v laboratoriju.

1.5.7 Analiza

Za vsako žival se določi delež nezrelih med vsemi (nezrelimi + zreliimi) eritrociti, tako da se prešteje skupaj vsaj 200 eritrocitov pri kostnem mozgu in 1 000 eritrocitov pri periferni krvi (17). Vsi preparati, skupaj s pozitivnimi in negativnimi kontrolnimi vzorci, naj se pred mikroskopsko analizo neodvisno kodirajo. V določanje incidence nezrelih eritrocitov z mikronukleusi se vključi vsaj 2 000 nezrelih eritrocitov na žival.

Dodatne informacije se lahko pridobijo s štetjem zrelih eritrocitov z mikronukleusi. Pri analizi mikroskopskih preparatov naj delež nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti ne bo manjši od 20 % kontrolne vrednosti. Kadar se živali tretirajo nepretrgano štiri tedne ali več, se lahko določi tudi incidenca mikronukleusov v vsaj 2 000 zrelih eritrocitih na žival. Sistemi za avtomatizirano analizo (slikovna analiza in pretočna citometrična analiza celičnih suspenzij) so sprejemljiva alternativa ročnemu določanju, če so ustrezno utemeljeni in validirani.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki za posamezne živali naj bodo prikazani v tabelah. Poskusna enota je žival. Za vsako analizirano žival posebej naj se navedejo število štetih nezrelih eritrocitov, število nezrelih eritrocitov z mikronukleusi in število nezrelih med vsemi eritrociti. Kadar se živali tretirajo nepretrgano štiri tedne ali več, se navedejo tudi podatki o zrelih eritrocitih, če so bili zbrani. Za vsako žival se navede delež nezrelih med vsemi eritrociti, in če je to primerno, odstotek eritrocitov z mikronukleusi. Če ni dokaza za razliko v odzivu med spoloma, se pri statistični analizi lahko združijo podatki za oba spola.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kakor je na primer z odmerkom povezano povečanje števila celic z mikronukleusi ali jasno povečanje števila celic z mikronukleusi v posamezni tretirani skupini ob posameznem vzorčenju. Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode (18) (19). Statistična značilnost naj ne bo edini odločilni dejavnik za pozitiven odziv. Dvoumni rezultati naj se razjasnijo z dodatnimi preizkusi, po možnosti ob prilagojenih poskusnih pogojih.

Pojmuje se, da preizkušana snov, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril, ni mutagena v tem preizkusu.

Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvoumni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultati preizkusa mikronukleusov pomenijo, da snov povzroča nastanek mikronukleusov, ki so posledica poškodb kromosomov ali mitotičnega aparata v eritroblastih preizkusne vrste. Negativni rezultati pomenijo, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ne povzroča nastanka mikronukleusov v nezrelih eritrocitih preizkusne vrste.

Obravnava naj se verjetnost, da preizkušana snov ali njeni metaboliti dosežejo krvni obtok ali posebej tarčno tkivo (npr. sistemska toksičnost).

3. POROČANJE

POROČILO O PREIZKUSU

Poročilo o preizkusu naj vsebuje naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

— utemeljitev izbire nosilca,

— topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Preizkusne živali:

- uporabljena vrsta/sev,
- število, starost in spol živali,
- vir, pogoji bivanja, prehrana itn.,
- teža posameznih živali na začetku preizkusa, skupaj z območjem telesne teže, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom za vsako skupino.

Preizkusni pogoji:

- podatki o pozitivnih in negativnih (nosilec/topilo) kontrolnih vzorcih,
- podatki študije za ugotavljanje območja, če je bila opravljena,
- razlogi za izbiro velikosti odmerka,
- podrobnosti o pripravi preizkušane snovi,
- podrobnosti o dajanju preizkušane snovi,
- razlogi za način dajanja,
- metode za preverjanje, ali je preizkušana snov dosegla krvni obtok ali tarčno tkivo, če je to primerno,
- način preračunavanja koncentracije preizkušane snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je to primerno,
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode,
- podroben opis programov tretiranja in vzorčenja,
- metode priprave mikroskopskih preparatov,
- metode merjenja toksičnosti,
- merila za štetje nezrelih eritrocitov z mikronukleusi,
- število analiziranih celic na žival,
- merila za določitev, ali je študija pozitivna, negativna ali dvoumna.

Rezultati:

- znaki toksičnosti,
- delež nezrelih eritrocitov med vsemi eritrociti,
- število nezrelih eritrocitov z mikronukleusi, navedeno za vsako žival posebej,
- srednja vrednost $\pm$ standardni odklon nezrelih eritrocitov z mikronukleusi na skupino,
- odvisnost med odmerkom in odzivom, kadar je to mogoče,
- uporabljene statistične analize in metode,
- podatki o sočasni in pretekli negativni kontroli,
- podatki o sočasni pozitivni kontroli.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. LITERATURA

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, str. 187-190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, str. 9-15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G., in Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, str. 61-118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., in Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, str. 29-80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N., in Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, v: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, izd. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, str. 555-558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., in Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, str. 103-112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R., in Shelby, M. E. (1990), The *in Vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, str. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T., in Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, str. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, str. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, str. 53-159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S., in Vannier, B. (1994), *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, str. 293-304.
- (12) Higashikuni, N., in Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, str. 313-319.
- (13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J., in Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, str. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofumi, T., in Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, str. 241-247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., in Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, str. 269-275.
- (16) Romagna, F., in Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, str. 91-104.
- (17) Gollapudi, B., in McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, str. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., in Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, v: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Poročilo, del 1, pregledan*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 115-141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G., in Savage, J. R. K. (1989), Statical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (izd.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Poročilo, del III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, str. 184-232.

PRILOGA 4D

„B.13/14. MUTAGENOST — PREIZKUS POVRATNE MUTACIJE PRI BAKTERIJAH

1. METODA

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 UVOD

Pri preizkusu bakterijskih povratnih mutacij se sevi vrst *Salmonella typhimurium* in *Escherichia coli*, ki potrebujejo aminokislino, uporabljajo za odkrivanje točkovnih mutacij, ki vključujejo substitucijo, adicijo ali delecijo enega ali nekaj baznih parov DNA (1) (2) (3). Princip tega preizkusa bakterijskih povratnih mutacij je, da zazna mutacije, ki obrnejo mutacije v preizkusnih sevih in obnovijo funkcionalno sposobnost bakterij za sintezo osnovne aminokislino. Povratno mutirane bakterije se zaznajo po sposobnosti rasti v odsotnosti aminokislino, ki jo starševski preizkusni sev potrebuje.

Točkovne mutacije so vzrok številnih genskih bolezni pri človeku in obstajajo tehtni dokazi, da so točkovne mutacije onkogenov in genov, zaviralcev rasti tumorjev somatskih celic, povezane z nastankom tumorjev pri človeku in poskusnih živalih. Preizkus bakterijskih povratnih mutacij je hiter, poceni in relativno lahko izvedljiv. Mnogi preizkusni sevi imajo več značilnosti, zaradi katerih so občutljivejši za zaznavanje mutacij, vključno z odzivnimi zaporedji DNA na mestih povratnih mutacij, povečano prepustnostjo celice za velike molekule in odstranitvijo DNA-popravljalnih mehanizmov ali okrepitevijo procesov popravljanja DNA, podvrženega napakam. Specifičnost preizkusnih sevov lahko da koristne informacije o vrstah mutacij, ki jih povzročijo genotoksične snovi. Na voljo je obsežna baza rezultatov za preizkuse bakterijskih povratnih mutacij za številne strukture in razvite so bile dobro uveljavljene metodologije za preizkušanje kemikalij z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, vključno s hlapnimi spojinami.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Preizkus povratnih mutacij pri vrsti *Salmonella typhimurium* ali *Escherichia coli* zazna mutacijo pri sevu, ki potrebuje aminokislino (histidin oziroma triptofan), s katero nastane sev, neodvisen od zunanje oskrbe z aminokislino.

Mutageni substitucije baznih parov so snovi, ki povzročijo zamenjavo baz v DNA. Pri preizkusu povratne mutacije takšna zamenjava lahko nastane na mestu izvirne mutacije ali na drugem mestu bakterijskega genoma.

Mutageni premika bralnega okvira so snovi, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov DNA in tako spremenijo bralni okvir RNA.

1.3 ZAČETNI PREUDARKI

Pri preizkusu bakterijskih povratnih mutacij se uporabljajo prokarionske celice, ki se od sesalskih razlikujejo v lastnostih, kakor so sprejemanje, presnova, kromosomska struktura in procesi popravljanja DNA. Za preizkuse, opravljene *in vitro*, so navadno potrebni zunanji viri aktivacije presnove. Sistemi aktivacije presnove *in vitro* ne morejo povsem posnemati razmer *in vivo* pri sesalcih. Preizkus torej ne daje neposrednih informacij o mutagenosti in rakotvornosti snovi pri sesalcih.

Preizkus bakterijskih povratnih mutacij se splošno uporablja kot začetno presejanje za odkrivanje genotoksičnega delovanja in zlasti delovanja, ki povzroči točkovne mutacije. Obsežna baza podatkov je pokazala, da mnoge kemikalije, ki pri tem preizkusu dajo pozitivni rezultat, kažejo mutageno delovanje tudi pri drugih preizkusih. Obstajajo primeri mutagenov, ki jih ta preizkus ne zazna; razlogi za te pomanjkljivosti se lahko pripišejo posebnim naravi zaznane končne točke, razlikam v aktivaciji presnove ali razlikam v

biološki razpoložljivosti. Po drugi strani pa lahko dejavniki, ki povečajo občutljivost preizkusa bakterijskih povratnih mutacij, privedejo do precenitve mutagenega delovanja.

Preizkus bakterijskih povratnih mutacij morda ne bo primeren za ocenjevanje nekaterih skupin nevarnih kemikalij, na primer močno baktericidnih spojin (npr. nekaterih antibiotikov) in tistih, za katere se domneva (ali ve), da motijo sistem podvojevanja prav v sesalskih celicah (npr. nekateri inhibitorji topoizomerase in nekateri nukleozidni analogi). Pri takšnih primerih bi bili lahko bolj primerni preizkusi mutacij pri sesalcih.

Čeprav so mnoge spojine, pri katerih je rezultat tega preizkusa pozitiven, rakotvorne snovi za sesalce, soodvisnost ni absolutna. Odvisna je od skupine nevarnosti kemikalije in obstajajo rakotvorne snovi, ki jih ta preizkus ne zazna, ker delujejo prek drugih mehanizmov, ki niso genotoksični, ali mehanizmov, ki jih v bakterijskih celicah ni.

1.4 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Suspenzije bakterijskih celic se izpostavijo preizkušani snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti zunanjega sistema za aktivacijo presnove. Pri metodi vključitve v ploščo se te suspenzije zmešajo s poltrdim gojiščem in takoj razlijejo po minimalnem gojišču. Pri metodi poprejšnje inkubacije se obdelovalna zmes inkubira in nato zmeša s poltrdim gojiščem pred nanosom na minimalno gojišče. Pri obeh tehnikah se po dveh ali treh dneh inkubacije preštejejo kolonije povratnih mutant in primerjajo s številom kolonij spontanah povratnih mutant na kontrolnih ploščah s topilom.

Opisanih je nekaj postopkov za izvedbo preizkusa bakterijskih povratnih mutacij. Med splošno uporabljanimi so metoda vključitve v ploščo (1) (2) (3) (4), metoda poprejšnje inkubacije (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuacijska metoda (9) (10) in suspenzijska metoda (11). Opisane so tudi prilagoditve za preizkušanje plinov ali hlapov (12).

Postopki, opisani v metodi, veljajo predvsem za metodo vključitve v ploščo in metodo poprejšnje inkubacije. Obe sta sprejemljivi za izvajanje preizkusa ob aktivaciji presnove in brez nje. Nekatere snovi se lahko učinkoviteje zaznajo z metodo poprejšnje inkubacije. Te snovi sodijo v skupine nevarnih kemikalij, ki vključujejo kratkoveržne alifatske nitrozamine, dvovalentne kovine, aldehide, azo barvila in diazo spojine, pirolizidinske alkaloide ter alil in nitro spojine (3). Priznано je tudi, da se pri uporabi standardnih postopkov, kakor sta metoda vključitve v ploščo ali metoda poprejšnje inkubacije, nekatere skupine mutagenov ne zaznajo vedno. Ti naj se obravnavajo kot 'posebni primeri' in močno se priporoča, da se za njihovo zaznavanje uporabijo nadomestni postopki. Določijo se lahko naslednji 'posebni primeri' (skupaj s primeri postopkov, ki bi se lahko uporabili za njihovo zaznavanje): azo barvila in diazo spojine (3) (5) (6) (13), plini in hlapne kemikalije (12) (14) (15) (16) ter glikozidi (17) (18). Odstopanje od standardnega postopka je treba znanstveno utemeljiti.

1.5 OPIS PREIZKUSNE METODE

1.5.1 Priprave

1.5.1.1 Bakterije

Sveže kulture bakterij se vzgajijo do pozne logaritemske faze ali zgodnje stacionarne faze rasti (približno 10^9 celic na ml). Kulture v pozni stacionarni fazi naj se ne uporabljajo. Kulture, ki se uporabijo v preizkusu, morajo obvezno imeti velik delež živih bakterij. Delež se lahko dokaže na podlagi podatkov o rastnih krivuljah iz preteklih kontrol ali pri vsakem preizkusu z določitvijo števila živih celic s štetjem na plošči.

Priporočena temperatura inkubacije je 37 °C.

Uporabi naj se vsaj pet sevov bakterij. Ti naj vključujejo štiri seve vrste *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 ali TA97a ali TA97; TA98 in TA100), za katere je bilo dokazano, da so zanesljivi in dajejo ponovljive rezultate med laboratoriji. Ti štirje sevi vrste *S. typhimurium* imajo na primarnem mestu povratne mutacije bazne pare GC in znana je možnost, da ne zaznajo nekaterih oksidirajočih mutagenov, prečnih povezovalcev in hidrazinov. Takšne snovi lahko zaznajo sevi *E. coli* WP2 ali *S. typhimurium* TA102 (19), ki imajo na primarnem mestu povratne mutacije bazni par AT. Priporočena kombinacija sevov je torej:

- *S. typhimurium* TA1535, in
- *S. typhimurium* TA1537 ali TA97 ali TA97a, in
- *S. typhimurium* TA98, in
- *S. typhimurium* TA100, in
- *E. coli* WP2 uvrA ali *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) ali *S. typhimurium* TA102.

Da bi se zaznali prečno povezovalni mutageni, bi bilo morda bolj primerno vključiti TA102 ali dodati sev *E. coli*, zmožen popravljanja DNA (npr. *E. coli* WP2 ali *E. coli* WP2 (pKM101)).

Uporabljajo naj se uveljavljeni postopki za pripravo založne kulture, preverjanje označevalcev in shranjevanje. Potreba po aminokislinah za rast naj se dokaže za vsak pripravek zamrznjene založne kulture (histidin za seve *S. typhimurium* in triptofan za seve *E. coli*). Podobno naj se preverijo druge fenotipske značilnosti, namreč: navzočnost ali odsotnost R-plazmidov, kadar je to primerno (tj. odpornost proti ampicilinu pri sevih TA98, TA100 in TA97a ali TA97, WP2 uvrA in WP2 uvrA (pKM101), in odpornost proti ampicilinu + tetraciklinu pri sevu TA 102); navzočnost značilnih mutacij (tj. mutacije rfa pri *S. typhimurium* prek občutljivosti za kristalvijolično in mutacije uvrA pri *E. coli* ali mutacije uvrB pri *S. typhimurium* prek občutljivosti za ultravijolično svetlobo) (2) (3). Število kolonij spontanah povratnih mutant pri sevih naj bo v območjih pogostnosti, pričakovanih glede na pretekle kontrolne podatke laboratorija, in po možnosti v območju, navedenem v literaturi.

1.5.1.2 Gojišče

Uporabljata se ustrezno minimalno gojišče (ki vsebuje npr. minimalno gojišče E po Vogel-Bonnerju in glukozo) in poltrdo gojišče, ki vsebuje histidin in biotin ali triptofan, da se omogoči nekaj delitev celic (1) (2) (9).

1.5.1.3 Aktivacija presnove

Bakterije naj se izpostavijo preizkušani snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti ustreznega sistema za aktivacijo presnove. Najpogostejše uporabljani sistem je postmitohondrijska frakcija z dodanim kofaktorjem (S9), pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kakor je Aroclor 1254 (1) (2), ali z zmesjo fenobarbitona in β — naftoflavona (18) (20) (21). Postmitohondrijska frakcija se navadno uporablja v koncentracijah od 5 do 30 % v/v v zmesi S9. Izbira in stanje sistema za aktivacijo presnove sta lahko odvisna od skupine nevarnosti preizkušane kemikalije. Včasih je primerno uporabiti več kakor eno koncentracijo postmitohondrijske frakcije. Pri azo barvilih in diazo spojinah bo morda bolj primerno uporabiti redukcijski sistem aktivacije presnove (6) (13).

1.5.1.4 Preizkušana snov/priprava

Trdne preizkušane snovi naj se pred obdelavo bakterij raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko dodajo neposredno v preizkusni sistem in/ali se pred obdelavo razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

Topilo/nosilec naj ne vzbuja suma, da kemično reagira s preizkušano snovjo, in naj bo združljivo s preživetjem bakterij in delovanjem S9 (22). Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadarkoli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca. Kadar se preizkušajo v vodi nestabilne snovi, naj se uporabijo brezvodna organska topila.

1.5.2 Preizkusni pogoji

1.5.2.1 Preizkusni sevi (glej 1.5.1.1)

1.5.2.2 Koncentracije izpostavljenosti

Med merili, ki jih je treba upoštevati pri določanju največje uporabljene količine preizkušane snovi, so citotoksičnost in topnost v končni obdelovalni zmesi.

Lahko je koristno, če se toksičnost in netopnost določita v poprejšnjem poskusu. Citotoksičnost se lahko zazna prek zmanjšanja števila kolonij povratnih mutant, čistine na bakterijskem ozadju ali zmanjšanja bakterijskega ozadja ali stopnje preživetja obdelanih kultur. Citotoksičnost snovi se lahko spremeni ob navzočnosti sistemov za aktivacijo presnove. Netopnost naj se oceni kot oborina v končni zmesi pri dejanskih pogojih preizkusa in naj bo vidna s prostim očesom.

Priporočena največja preizkusna koncentracija za topne necitotoksične snovi je 5 mg/ploščo ali 5 µl/ploščo. Pri necitotoksičnih snoveh, ki niso topne pri koncentracijah 5 mg/ploščo ali 5 µl/ploščo, naj bo ena ali več preizkušenih koncentracij netopnih v končni obdelovalni zmesi. Preizkušane snovi, ki so citotoksične že pri koncentracijah, manjših od 5 mg/ploščo ali 5 µl/ploščo, naj se preizkušajo do citotoksične koncentracije. Oborina ne sme vplivati na štetje.

Uporabi naj se vsaj pet različnih koncentracij preizkušane snovi, ki jih je mogoče analizirati, z intervalom približno pol log (tj. 0,10) med preizkusnimi točkami pri začetnem poskusu. Primerni so lahko manjši intervali, kadar se raziskuje odvisnost med koncentracijo in odzivom. Lahko se izvedejo preizkusi s koncentracijami, večjimi od 5 mg/ploščo ali 5 µl/ploščo, kadar se ocenjujejo snovi, ki vsebujejo znatne količine potencialno mutagenih nečistot.

1.5.2.3 Negativni in pozitivni kontrolni vzorci

V vsak preizkus naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo ali nosilec) kontrolni vzorci, specifični za sev, ob aktivaciji presnove in brez nje. Izberejo naj se koncentracije pozitivne kontrole, ki dokazujejo učinkovito izvedbo vsakega preizkusa.

Pri preizkusih, pri katerih se uporabi sistem aktivacije presnove, naj se referenčna(-e) snov(-i) pozitivne kontrole izbere(-jo) na podlagi vrste uporabljenih bakterijskih sevov.

Naslednje snovi so primeri ustreznih snovi pozitivne kontrole za preizkuse z aktivacijo presnove:

Snov	Št. CAS	Št. Eines
9,10-dimetilantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetilbenzo(a) antracen	57-97-6	200-359-5
benzo(a) piren	50-32-8	200-028-5
2-aminoantracen	613-13-8	210-330-9
ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
ciklofosfamid monohidrat	6055-19-2	

Naslednja snov je ustrezna snov pozitivne kontrole za metodo redukcijske aktivacije presnove:

Snov	Št. CAS	Št. Eines
Kongo rdeče	573-58-0	209-358-4

2-aminoantracen naj se ne uporablja kot edini kazalec učinkovitosti zmesi S9. Če se uporabi 2-aminoantracen, naj bo tudi za vsako serijo S9 značilen mutagen, ki potrebuje aktivacijo presnove z mikrosomskimi encimi, npr. benzo(a) piren, dimetilbenzo antracen.

Naslednje snovi so primeri snovi pozitivne kontrole za posamezne seve, za preizkuse, izvedene brez zunanjega sistema aktivacije presnove:

Snov	Št. CAS	Št. Eines	Sev
natrijev azid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 in TA 100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 in TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 in TA 97a
kumol hidroperoksid	80-15-9	201-254-7	TA 102
mitomicin C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA in TA 102
1-metil-3-nitro-1-nitrozogvanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA in WP2uvrA(pKM101)
4-nitrokinolin-1-oksidi	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA in WP2uvrA(pKM101)
furilfuramid (AF2)	3688-53-7		sevi s plazmidi

Lahko se uporabijo druge ustrezne referenčne snovi pozitivne kontrole. Uporabijo naj se kemikalije pozitivne kontrole, ki sodijo v isto skupino nevarnosti kakor preizkušana kemikalija, kadar so na voljo.

Vključijo naj se negativni kontrolni vzorci, ki jih sestavlja le topilo ali nosilec brez preizkušane snovi, obdelani na enak način kakor obdelovalne skupine. Uporabijo se tudi neobdelani kontrolni vzorci, razen če pretekli kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

1.5.3 Postopek

Pri metodi vključitve v ploščo (1) (2) (3) (4) brez aktivacije presnove se navadno 0,05 ml ali 0,1 ml preizkušane raztopine, 0,1 ml sveže bakterijske kulture (ki vsebuje približno 10^8 živih celic) in 0,5 ml sterilnega pufla zmeša z 2,0 ml poltrdega gojišča. Pri preizkusu z aktivacijo presnove se navadno 0,5 ml zmesi za aktivacijo presnove, ki vsebuje ustrezno količino postmitohondrijske frakcije (v območju od 5 do 30 % v/v v zmesi za aktivacijo presnove), zmeša s poltrdim gojiščem (2,0 ml) skupaj z bakterijami in preizkušano snovjo/raztopino. Vsebina vsake epruvete se premeša in razlije po površini plošče minimalnega gojišča. Pred inkubacijo naj se poltrdo gojišče strdi.

Pri metodi poprejšnje inkubacije (2) (3) (5) (6) se preizkušana snov/raztopina inkubira skupaj s preizkusnim sevom (ki vsebuje približno 10^8 živih celic) in sterilnim pufrom ali sistemom za aktivacijo presnove (0,5 ml), navadno 20 minut ali več pri 30-37 °C, preden se zmeša s poltrdim gojiščem in razlije na površino plošče minimalnega gojišča. Navadno se 0,05 ali 0,1 ml preizkušane snovi/raztopine, 0,1 ml bakterij in 0,5 ml zmesi S9 ali sterilnega pufla zmeša z 2,0 ml poltrdega gojišča. Epruvete se med inkubacijo prezračujejo s stresalnikom.

Za ustrezno oceno nihanja naj se za vsako velikost odmerka uporabijo tri plošče. Uporaba dveh plošč je sprejemljiva, kadar je znanstveno utemeljena. Občasna izguba plošče ne pomeni nujno neveljavnega preizkusa.

Plinaste ali hlapne snovi naj se preizkušajo z ustreznimi metodami, na primer v zatesnjenih posodah (12) (14) (15) (16).

1.5.4 Inkubacija

Vse plošče posameznega preizkusa naj se inkubirajo 48-72 ur pri 37 °C. Po inkubaciji se določi število kolonij povratnih mutant na ploščo.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki se prikažejo kot število kolonij povratnih mutant na ploščo. Navede se tudi število kolonij povratnih mutant na ploščah negativne (kontrolni vzorec s topilom in neobdelani kontrolni vzorec, če se uporabi) in pozitivne kontrole. Navedejo se število na posameznih ploščah, srednja vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo in standardni odklon za preizkušano snov ter pozitivne in negativne (neobdelane in/ali s topilom) vzorce.

Preverjanje jasnega pozitivnega odziva ni potrebno. Dvourni rezultati naj se razjasnijo z dodatnimi preizkusi, po možnosti ob prilagojenih poskusnih pogojih. Negativne rezultate je treba potrditi za vsak primer posebej. Kadar se pojmuje, da potrditev negativnih rezultatov ni potrebna, naj se to utemelji. V nadaljnjih poskusih naj se preuči možnost prilagoditve preizkusnih parametrov, da se razširi območje analiziranih pogojev. Preizkusni parametri, ki bi se lahko prilagodili, vključujejo intervale med koncentracijami, metodo obdelave (vključitev v ploščo ali poprejšnja inkubacija v suspenziji) in pogoje aktivacije presnove.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kakor sta na primer s koncentracijo povezano povečanje v preizkušanem območju in/ali ponovljivo povečanje števila kolonij povratnih mutant na ploščo pri eni ali več koncentracijah pri vsaj enem sevu s sistemom za aktivacijo presnove ali brez njega (23). Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode (24). Vendar pa naj statistična značilnost ne bo edini odločilni dejavnik za pozitivni odziv.

Pojmuje se, da preizkušana snov, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril, ni mutagena v tem preizkusu.

Čprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvourni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultati preizkusa bakterijskih povratnih mutacij pomenijo, da snov povzroča točkovne mutacije z zamenjavo baz ali premikom bralnega okvira v genomu *Salmonella typhimurium* in/ali *Escherichia coli*. Negativni rezultati pomenijo, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ni mutagena za preizkusno vrsto.

3. POROČANJE

POROČILO O PREIZKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

- utemeljitev izbire topila/nosilca,
- topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Sevi:

- uporabljeni sevi,
- število celic na kulturo,
- značilnosti seva.

Preizkusni pogoji:

- količina preizkušane snovi na ploščo (mg/ploščo ali µl/ploščo), skupaj z razlogi za izbiro odmerka in števila plošč na koncentracijo,
- uporabljena gojišča,
- vrsta in sestava sistema za aktivacijo presnove, skupaj z merili sprejemljivosti,
- postopki obdelave.

Rezultati:

- znaki toksičnosti,
- znaki obarjanja,
- število kolonij na posameznih ploščah,
- srednja vrednost števila kolonij povratnih mutant na ploščo in standardni odklon,
- odvisnost med odmerkom in odzivom, kadar je to mogoče,
- statistične analize, če so bile opravljene,
- podatki o sočasni negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,
- podatki o pretekli negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. LITERATURA

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

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

PRILOGA 4E

„B.17. MUTAGENOST — PREIZKUS GENSKIH MUTACIJ V CELICAH SESALCEV IN VITRO**1. METODA**

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 476, *In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test* (1997).

1.1 UVOD

Preizkus genskih mutacij v celicah sesalcev *in vitro* se lahko uporablja za odkrivanje genskih mutacij, ki jih povzročajo kemične snovi. Primerne celične linije vključujejo celice limfoma miši L5178Y, linije celic kitajskega hrčka CHO, CHO-AS52 in V79 in človeške limfoblaste TK6 (1). V teh celičnih linijah najpogosteje uporabljane genske končne točke izmerijo mutacijo na lokusih za timidin-kinazo (TK) in hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (HPRT) in na transgenu za ksantin-gvanin-fosforibozil-transferazo (XPRT). Preizkusi mutacij TK, HPRT in XPRT zaznajo različne vrste genskih pojavov. Lokacija TK in XPRT na avtosomih lahko omogoči zaznavo genskih pojavov (npr. obsežnih delecij), ki se ne zaznajo na lokusu za HPRT na X kromosomih (2) (3) (4) (5) (6).

Pri preizkusu genskih mutacij v celicah sesalcev *in vitro* se lahko uporabijo kulture trajnih celičnih linij ali celičnih sevov. Uporabljene celice se izberejo na podlagi zmožnosti rasti v kulturi in stabilnosti pogostnosti spontanah mutacij.

Za preizkuse, opravljene *in vitro*, so navadno potrebni zunanji viri aktivacije presnove. Takšen sistem aktivacije presnove ne more povsem posnemati razmer *in vivo* pri sesalcih. Treba je paziti, da se prepreči nastanek razmer, ki bi vodile do rezultatov, ne izražajočih prave mutagenosti. Pozitivni rezultati, ki ne izražajo prave mutagenosti, so lahko posledica sprememb pH, osmolarnosti ali visoke ravni citotoksičnosti (7).

Ta preizkus se uporablja za iskanje možnih mutagenov in rakotvornih snovi za sesalce. Mnoge spojine, pri katerih je rezultat tega preizkusa pozitiven, so rakotvorne snovi za sesalce; vendar pa soodvisnost med tem preizkusom in rakotvornostjo ni popolna. Odvisna je od skupine nevarnosti kemikalije in vedno več je dokazov, da obstajajo rakotvorne snovi, ki jih ta preizkus ne zazna, ker, kakor kaže, delujejo prek drugih mehanizmov, ki niso genotoksični, ali mehanizmov, ki jih v sesalskih celicah ni (6).

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Napredna mutacija: genska mutacija starševskega tipa mutirane oblike, ki povzroči spremembo ali izgubo encimskega delovanja kodirane beljakovine.

Mutageni substitucije baznih parov: snovi, ki povzročijo zamenjavo ene ali več baznih parov v DNA.

Mutageni premika bralnega okvira: snovi, ki povzročijo adicijo ali delecijo enega ali več baznih parov v molekuli DNA.

Čas izražanja fenotipa: obdobje, v katerem se nespremenjeni genski produkti odstranijo iz na novo mutiranih celic.

Pogostnost mutant: število opaženih mutiranih celic, deljeno s številom živih celic.

Relativna skupna rast: povečanje števila celic v časovnem obdobju v primerjavi s kontrolno populacijo celic; izračunano kot zmnožek rasti v suspenziji glede na negativno kontrolo in učinkovitosti kloniranja glede na negativno kontrolo.

Relativna rast v suspenziji: povečanje števila celic v obdobju izražanja glede na negativno kontrolo.

Sposobnost preživetja: učinkovitost tvorbe klonov obdelanih celic v času nasaditve v selektivnih pogojih po času izražanja.

Preživetje: učinkovitost tvorbe klonov obdelanih celic, ko se nasadijo na ploščo ob koncu obdelave; preživetje se navadno izraža v odvisnosti od preživetja kontrolne populacije celic.

1.3 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Celice brez timidin-kinaze (TK) so zaradi mutacije $TK^{+/-}$ $TK^{-/-}$ odporne proti citotoksičnim učinkom pirimidinskega analoga trifluorotimidina (TFT). Celice s timidin-kinazo so občutljive za TFT, ki zavira celično presnovo in ustavi celično delitev. Mutirane celice so tako sposobne množitve v navzočnosti TFT, medtem ko normalne celice, ki vsebujejo timidin-kinazo, to niso. Podobno se celice brez HPRT ali XPRT selekcionirajo z odpornostjo proti 6-tiogvaninu (TG) ali 8-azogvaninu (AG). Lastnosti preizkušane snovi naj se skrbno preučijo, če se v katerem koli od preizkusov genskih mutacij v celicah sesalcev preizkuša bazni analog ali spojina, sorodna selektivni snovi. Preuči naj se na primer vsaka domnevna selektivna toksičnost preizkušane snovi za mutirane in nemutirane celice. Treba je potrditi učinkovitost selekcijskega sistema/snovi, kadar se preizkušajo kemikalije, ki so po strukturi sorodne selektivni snovi (8).

Celice v suspenziji ali enoplastni kulturi se za ustrezno časovno obdobje izpostavijo preizkušani snovi, ob aktivaciji presnove in brez nje, in se kultivirajo na novem gojišču, da se določi citotoksičnost in se omogoči izražanje fenotipa pred selekcijo mutant (9) (10) (11) (12) (13). Citotoksičnost se navadno določi z merjenjem relativne učinkovitosti tvorbe klonov (preživetje) ali relativne skupne rasti kultur po obdelovanju. Obdelovane kulture se vzdržujejo na ravnem gojišču dovolj dolgo obdobje, značilno za vsak izbran lokus in vrsto celic, ki omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipa induciranih mutacij. Pogostnost mutant se določi z nasaditvijo znanega števila celic v gojišče s selektivno snovjo, da se zaznajo mutirane celice, in v gojišče brez selektivne snovi, da se določi učinkovitost tvorbe klonov (sposobnost preživetja). Po ustrezno dolgi inkubaciji se preštejejo kolonije. Pogostnost mutant se izračuna iz števila mutiranih kolonij v selektivnem gojišču in iz števila kolonij v neselektivnem gojišču.

1.4 OPIS PREIZKUSNE METODE

1.4.1 Priprave

1.4.1.1 Celice

Na voljo je več vrst celic, ki se lahko uporabijo pri tem preizkusu, skupaj s subkloni celic L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 ali TK6. Za vrsto celic, uporabljeno pri tem preizkusu, naj bodo dokazane občutljivost za kemične mutagene, velika učinkovitost tvorbe klonov in stabilna pogostnost spontanah mutacij. Preveri naj se, ali celice niso okužene z mikoplazmo, in če so, naj se ne uporabijo.

Preizkus naj bo načrtovan tako, da bosta njegova občutljivost in moč vnaprej določeni. Število uporablenih celic, kultur in koncentracij preizkušane snovi naj izraža te določene parametre (14). Najmanjše število živih celic, ki preživijo obdelovanje in se uporabijo v vsaki fazi preizkusa, naj temelji na pogostnosti spontanah mutacij. Splošno vodilo je, da se uporabi število celic, ki je vsaj 10-kratna recipročna vrednost pogostnosti spontanah mutacij. Vendar se priporoča, da se uporabi vsaj 10^6 celic. Na voljo naj bodo zadovoljivi pretekli podatki o uporabljenem celičnem sistemu, ki kažejo na dosledno učinkovitost preizkusa.

1.4.1.2 Gojišče in pogoji kultiviranja

Uporabijo naj se ustrezna gojišča za kulture in pogoji inkubacije (posode za kulture, temperatura, koncentracija CO_2 in vlažnost). Gojišča naj se izberejo glede na selektivne sisteme in vrsto celic, ki se uporabijo v preizkusu. Posebej pomembno je, da se izberejo takšni pogoji kultiviranja, ki zagotavljajo optimalno rast celic v času izražanja in sposobnost tvorjenja kolonij mutiranih, pa tudi nemutiranih celic.

1.4.1.3 *Priprava kultur*

Celice se namnožijo iz založnih kultur, nasadijo v gojišče in inkubirajo pri 37 °C. Pred uporabo v tem preizkusu bo morda iz kultur treba odstraniti že obstoječe mutirane celice.

1.4.1.4 *Aktivacija presnove*

Celice naj se izpostavijo preizkušani snovi ob navzočnosti in ob odsotnosti ustreznega sistema za aktivacijo presnove. Najpogosteje uporabljeni sistem je postmitohondrijska frakcija z dodanim kofaktorjem (S9), pripravljena iz jeter glodavcev, ki so bila obdelana s sredstvi za encimsko indukcijo, kakor je Aroclor 1254 (15) (16) (17) (18), ali z zmesjo fenobarbitona in β — naftoflavona (19) (20).

Postmitohondrijska frakcija se navadno uporablja v koncentracijah 1-10 % v/v v končnem preizkusnem gojišču. Izbira in stanje sistema za aktivacijo presnove sta lahko odvisna od skupine nevarnosti preizkušane kemikalije. Včasih je primerno uporabiti več kakor eno koncentracijo postmitohondrijske frakcije.

Vrsta razvojnih dosežkov lahko skupaj s pridobivanjem gensko spremenjenih celičnih linij, v katerih se izražajo geni za točno določene aktivirajoče encime, daje možnosti za endogeno aktivacijo. Izbira uporabljanih celičnih linij naj bo znanstveno utemeljena (npr. s pomembnostjo izoencima citokrom P450 za presnovo preizkušane snovi).

1.4.1.5 *Priprava preizkušane snovi*

Trdne preizkušane snovi naj se pred obdelavo celic raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko dodajo neposredno v preizkusni sistem in/ali pred obdelavo razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

1.4.2 **Preizkusni pogoji**

1.4.2.1 *Topilo/nosilec*

Topilo/nosilec naj ne vzbuja suma, da kemično reagira s preizkušano snovjo, in naj bo združljivo s preživetjem celic in delovanjem S9. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadarkoli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca. Kadar se preizkušajo v vodi nestabilne snovi, naj se uporabijo brezvodna organska topila. Voda se lahko odstrani z molekulskim sitom.

1.4.2.2 *Koncentracije izpostavljenosti*

Med merili, ki jih je treba upoštevati pri določanju najvišje koncentracije, so citotoksičnost, topnost v preizkusnem sistemu in spremembe v pH ali osmolarnosti.

Citotoksičnost naj se določi ob aktivaciji presnove in brez nje v glavnem poskusu z uporabo ustreznega kazalca celične neokrnjenosti in rasti, kakor sta relativna učinkovitost tvorbe klonov (preživetje) ali relativna skupna rast. Lahko je koristno, če se citotoksičnost in topnost določita v poprejšnjem poskusu.

Uporabijo naj se vsaj štiri koncentracije, ki jih je mogoče analizirati. Pri citotoksičnosti naj te koncentracije zajemajo območje od največje toksičnosti do majhne toksičnosti ali netoksičnosti; to bo navadno pomenilo, da razlika med koncentracijami ne bo smela biti večja od faktorja med 2 in $\sqrt{10}$. Če največja koncentracija temelji na citotoksičnosti, naj povzroči približno 10-20 % (vendar ne manj kakor 10 %) relativno preživetje (relativna učinkovitost tvorbe klonov) ali relativno skupno rast. Za sorazmerno necitotoksične snovi naj bo največja preizkušana koncentracija 5 mg/ml, 5 μ l/ml oziroma 1,01 M, tista, ki je najnižja.

Sorazmerno netopne snovi naj se preizkušajo do ali prek meje topnosti v pogojih kultiviranja. Netopnost naj se določi v končnem obdelovalnem gojišču, kateremu so izpostavljene celice. Lahko je koristno oceniti topnost na začetku in na koncu obdelave, saj se topnost med izpostavitvijo v preizkusnem sistemu lahko spremeni zaradi navzočnosti celic, S9, seruma itn. Netopnost se lahko zazna s prostim očesom. Oborina ne sme vplivati na štetje.

1.4.2.3 Kontrolni vzorci

V vsak poskus naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo ali nosilec) kontrolni vzorci, ob aktivaciji presnove in brez nje. Kadar se uporabi aktivacija presnove, mora biti kemikalija pozitivne kontrole tista, pri kateri je za mutageni odziv potrebna aktivacija.

Primeri snovi pozitivne kontrole vključujejo:

Stanje aktivacije presnove	Lokus	Snov	Št. CAS	Št. Eines
Ni zunanje aktivacije presnove	HPRT	etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
		N-etil-N-nitrozo-sečnina	759-73-9	212-072-2
	TK (majhne in velike kolonije)	metil metansulfonat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	etil metansulfonat	62-50-0	200-536-7
		N-etil-N-nitrozo-sečnina	759-73-9	212-072-2
Zunanja aktivacija presnove	HPRT	3-metilholantren	56-49-5	200-276-4
		dimetil nitrozamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimetilbenzo antracen	57-97-6	200-359-5
	TK (majhne in velike kolonije)	ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
		ciklofosfamidmonohidrat	6055-19-2	
		benzo(a) piren	50-32-8	200-028-5
		3-metilholantren	56-49-5	200-276-5
	XPRT	dimetil nitrozamin (pri velikih koncentracijah S-9)	62-75-9	200-549-8
		benzo(a) piren	50-32-8	200-028-5

Lahko se uporabijo druge ustrezne referenčne snovi pozitivne kontrole, npr. če ima laboratorij bazo preteklih podatkov za 5-bromo 2'-dioksiuridin (št. CAS 59-14-3, št. Eines 200-415-9), se lahko uporabi tudi ta referenčna snov. Uporabijo naj se kemikalije pozitivne kontrole, ki sodijo v isto skupino nevarnosti kakor preizkušana kemikalija, kadar so na voljo.

Vključijo naj se negativni kontrolni vzorci, ki jih sestavlja le topilo ali nosilec v obdelovalnem gojišču, obdelani enako kakor obdelovane skupine. Uporabijo se tudi neobdelani kontrolni vzorci, razen če pretekli kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

1.4.3 Postopek

1.4.3.1 Obdelava s preizkušano snovjo

Množiče se celice naj se izpostavijo preizkušani snovi ob aktivaciji presnove in brez nje. Čas izpostavljenosti naj bo ustrezno dolg (navadno zadostuje 3-6 ur). Čas izpostavljenosti lahko traja en celični ciklus ali več.

Pri vsaki preizkušeni koncentraciji se lahko obdelata dve vzporedni kulturi ali le ena. Kadar se uporabi le ena kultura, naj se poveča število koncentracij, da se zagotovi zadostno število kultur za analizo (npr. vsaj osem koncentracij, ki jih je mogoče analizirati). Uporabita naj se dve vzporedni kulturi negativne (topilo) kontrole.

Plinaste ali hlapne snovi naj se preizkušajo z ustreznimi metodami, na primer v zatesnjenih posodah za kulture (21) (22).

1.4.3.2 Merjenje preživetja, sposobnosti preživetja in pogostnosti mutant

Ob koncu izpostavljenosti se celice sperejo in kultivirajo, da se določi preživetje in omogoči izražanje fenotipa mutant. Merjenje citotoksičnosti z določanjem relativne učinkovitosti tvorbe klonov (preživetje) ali relativne skupne rasti kultur se navadno začne po obdelovanju.

Vsak lokus potrebuje določen najmanjši čas za skoraj optimalno izražitev fenotipa na novo induciranih mutacij (HPRT in XPRT potrebuje vsaj 6-8 dni, TK pa vsaj 2 dni). Celice naj se gojijo na gojišču s selektivno(-imi) snovjo(-mi) in na gojišču brez takšnih snovi, da se določita število mutant in učinkovitost tvorbe klonov. Merjenje sposobnosti preživetja (ki se uporabi za izračun pogostnosti mutant) se začne ob koncu časa izražanja z nasaditvijo v neselektivno gojišče.

Če dá preizkušana snov pri preizkusu L5178Y TK⁺ pozitiven rezultat, naj se pri vsaj eni od preizkusnih kultur (največja pozitivna koncentracija) ter pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih kolonije razvrstijo po velikosti. Če dá preizkušana snov pri preizkusu L5178Y TK⁺ negativen rezultat, naj se kolonije razvrstijo po velikosti pri negativnih in pozitivnih kontrolnih vzorcih. Razvrstitev kolonij po velikosti se lahko izvede tudi pri študijah, pri katerih se uporabi TK6TK⁺.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki naj vključujejo citotoksičnost in sposobnost preživetja, število kolonij in pogostnost mutant za obdelane in kontrolne kulture. Pri pozitivnem odzivu pri preizkusu L5178Y TK⁺ se kolonije štejejo z upoštevanjem merila velikih in majhnih kolonij pri vsaj eni od koncentracij preizkušane snovi (največja pozitivna koncentracija) ter pri negativni in pozitivni kontroli. Molekularne in citogenetske lastnosti mutant z velikimi in majhnimi kolonijami so bile podrobno raziskane (23) (24). Pri preizkusu TK⁺ se kolonije štejejo z upoštevanjem merila kolonij z normalno rastjo (velike) in počasno rastjo (majhne) (25). Mutirane celice z najboljšežnejšimi genskimi poškodbami imajo daljši podvojitveni čas in zato sestavljajo majhne kolonije. Obseg poškodb se giblje od izgube celega gena do kromosomskih aberacij, vidnih pri kariotipu. Nastanek mutant z majhnimi kolonijami se povezuje s kemikalijami, ki povzročajo obsežne kromosomske aberacije (26). Manj resno prizadete mutirane celice rastejo s podobno hitrostjo kakor starševske celice in sestavljajo velike kolonije.

Navede naj se preživetje (relativna uspešnost tvorbe klonov) ali relativna skupna rast. Pogostnost mutant naj se izrazi kot število mutiranih celic na število preživelih celic.

Navedejo se podatki za posamezne kulture. Vsi podatki naj bodo povzeti v tabelah.

Preverjanje jasnega pozitivnega odziva ni potrebno. Dvoumni rezultati naj se razjasnijo z dodatnimi preizkusi, po možnosti ob prilagojenih poskusnih pogojih. Negativne rezultate je treba potrditi za vsak primer posebej. Kadar se pojmuje, da potrditev negativnih rezultatov ni potrebna, naj se to utemlji. Pri dvoumnih ali negativnih rezultatih naj se v nadaljnjih poskusih preuči možnost prilagoditve preizkusnih parametrov, da se razširi območje analiziranih pogojev. Preizkusni parametri, ki bi se lahko prilagodili, vključujejo intervale med koncentracijami in pogoje aktivacije presnove.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kakor je na primer s koncentracijo povezano povečanje ali ponovljivo povečanje pogostnosti mutant. Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode. Statistična značilnost naj ne bo edini odločilni dejavnik za pozitiven odziv.

Pojmuje se, da preizkušana snov, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril, ni mutagena v tem sistemu.

Čeprav bo večina študij dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvoumni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultati preizkusa genskih mutacij v celicah sesalcev *in vitro* pomenijo, da preizkušana snov povzroča genske mutacije v uporabljenih kultiviranih sesalskih celicah. Ponovljiv rezultat pri koncentraciji s pozitivnim odzivom je najbolj pomemben. Negativni rezultati pomenijo, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ne povzroča genskih mutacij v uporabljenih kultiviranih sesalskih celicah.

3. POROČANJE

POROČILO O PREIZKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

- utemeljitev izbire nosilca/topila,
- topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Celice:

- vrsta in vir celic,
- število celičnih kultur,
- število pasaj celic, če je to primerno,
- metode vzdrževanja celične kulture, če je to primerno,
- odsotnost mikoplazme.

Preizkusni pogoji:

- razlogi za izbiro koncentracij in števila kultur, tudi npr. podatki o citotoksičnosti in mejah topnosti, če so na voljo,
- sestava gojišč, koncentracija CO₂,
- koncentracija preizkušane snovi,
- volumen dodanega nosilca in preizkušane snovi,
- temperatura inkubacije,
- čas inkubacije,
- trajanje obdelave,
- gostota celic med obdelavo,
- vrsta in sestava sistema za aktivacijo presnove, skupaj z merili sprejemljivosti,
- pozitivni in negativni kontrolni vzorci,
- dolžina časa izražanja (skupaj s številom nasajenih celic ter programom kultiviranja na novem gojišču in dodajanja hranil, če je to primerno),
- selektivne snovi,
- merila za določitev, ali je preizkus pozitiven, negativen ali dvoumen,

- uporabljene metode za določanje števila živih in mutiranih celic,
- opredelitev, katera velikost in tip kolonij se upoštevata (vključno z merili za ‚majhne‘ in ‚velike‘ kolonije, če je to primerno).

Rezultati:

- znaki toksičnosti,
- znaki obarjanja,
- podatki o pH in osmolarnosti med izpostavljenostjo preizkusni snovi, če sta bila določena,
- velikost kolonij, če je določena, vsaj za negativne in pozitivne kontrolne vzorce,
- usposobljenost laboratorija za zaznavanje mutant z majhnimi kolonijami pri sistemu L5178Y TK⁺/-, kadar je to primerno,
- odvisnost med odmerkom in odzivom, kadar je to mogoče,
- statistične analize, če so bile opravljene,
- podatki o sočasni negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli,
- podatki o pretekli negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,
- pogostnost mutant.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. LITERATURA

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

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr., in Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, str. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W., in Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, str. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., in Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate — and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, str. 133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G., in Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK^{+/−} — TK^{+/−} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, v: Kilbey, B. J., idr. (izd.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, str. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B., in Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, v: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., izd., Cambridge University Press, str. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N., in Mazzaccolo, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome- Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, str. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J., in Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31, str. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G., in Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK^{+/−} — Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, str. 61-108.
- (18) Maron, D. M., in Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, str. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M., in Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro Genotoxicity Assays, Mutagenesis* 7, str. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K., in Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, v: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R., in Philpot, R. M. (izd.), Elsevier, North-Holland, str. 85-88.
- (21) Krahm, D. F., Barsky, F. C., in McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, v: Ticc, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (izd.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, str. 91-103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P., in Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, str. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A., in Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, str. 51-55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T., in Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine, Resistant (TFT⁺) Mutants of L5178Y/TK^{+/−} — Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, str. 161-174.
- (25) Yandell, D. W., Dryja, T. P., in Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.* 229, str. 89-102.
- (26) Moore, M. M., in Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/−} — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, str. 609-614.

PRILOGA 4F

„B.23. PREIZKUS KROMOSOMSKIH ABERACIJ V SPERMATOGONIJIH SESALCEV**1. METODA**

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 UVOD

Namen preizkusa kromosomskih aberacij v sesalskih spermatogonijah *in vivo* je določiti snovi, ki povzročijo strukturne kromosomske aberacije v spermatogonijah sesalcev (1) (2) (3) (4) (5). Ločimo dva tipa strukturnih aberacij, kromosomski tip in kromatidni tip. Večina kemičnih mutagenov povzroči aberacije kromatidnega tipa, nastopajo pa tudi aberacije kromosomskega tipa. Ta metoda ni namenjena določanju numeričnih aberacij in se navadno ne uporablja v ta namen. Kromosomske mutacije in podobni pojavi so vzrok številnih genskih bolezni pri človeku.

S tem preizkusom se določajo kromosomski pojavi v spermatogonijah in zato se pričakuje, da preizkus napove povzročitev dednih mutacij v kličnih celicah.

Pri tem preizkusu se redno uporabljajo glodavci. Ta citogenetski preizkus *in vivo* zazna kromosomske aberacije pri mitotični spermatogoniji. Druge tarčne celice niso predmet te metode.

Da se zaznajo aberacije kromatidnega tipa v spermatogonijah, naj se pregleda prva mitotična delitev celic po obdelavi, preden se lezije izgubijo v naslednjih celičnih delitvah. Dodatne informacije o obdelanih spermatogonijah se lahko pridobijo z analizo aberacij kromosomskega tipa pri mejotskih kromosomih v diakinezi-metafazi I, ko obdelane celice postanejo spermatociti.

Ta preizkus *in vivo* je namenjen ugotavljanju, ali so mutageni somatskih celic aktivni tudi v kličnih celicah. Poleg tega je ta preizkus na spermatogonijah primeren za ocenjevanje nevarnosti mutagenosti, ker omogoča upoštevanje dejavnikov presnove *in vivo*, farmakokinetike in popravljanja DNA.

V modu so številne generacije spermatogonijev, ki so različno občutljive za kemično obdelavo. Zaznane aberacije tako pomenijo skupni odziv obdelanih populacij spermatogonijev, pri čemer prevladujejo številnejši diferencirani spermatogoniji. Zaradi fizične in fiziološke prepreke Sertolijevih celic in prepreke med krvjo in modom so različne generacije spermatogonijev lahko izpostavljene krvnemu obtoku ali pa ne, odvisno od njihovega položaja v modu.

Če obstajajo dokazi, da preizkušana snov ali reaktivni metabolit ne bo dosegel tarčnega tkiva, ta preizkus ni primeren.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Aberacija kromatidnega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom posameznih kromatid ali prelom in združitev med kromatidama.

Aberacija kromosomskega tipa: strukturna poškodba kromosoma, izražena kot prelom ali prelom in združitev obeh kromatid na istem mestu.

Presledek: akromatska lezija, manjša od širine ene kromatide, ob zelo majhni nepravilnosti kromatid.

Numerična aberacija: število kromosomov, drugačno od normalnega števila, ki je značilno za uporabljene živali.

Poliploidija: večkratnik haploidnega števila kromosomov (n), razen diploidnega števila (tj. $3n$, $4n$ in tako naprej).

Strukturna aberacija: sprememba v strukturi kromosoma, ki je vidna pri mikroskopskem pregledu metafaze celične delitve v obliki delecij, transpozicij ali recipročnih translokacij.

1.3 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Živali se primerno izpostavijo preizkušani snovi in se v primernem času po tretiranju žrtvujejo. Pred žrtvovanjem se živali tretirajo s snovjo za ustavitev metafaze (npr. kolhicinom, Colcemidom®). Nato se pripravijo in obarvajo preparati kromosomov iz kličnih celic ter določijo kromosomske aberacije v metafaznih celicah.

1.4 OPIS PREIZKUSNE METODE

1.4.1 Priprave

1.4.1.1 Izbor živalske vrste

Navadno se uporabljajo samci kitajskega hrčka in miši. Lahko pa se uporabijo tudi samci drugih ustreznih vrst sesalcev. Uporabijo naj se splošno uporabljani laboratorijski sevi mladih zdravih odraslih živali. Ob začetku študije naj bo nihanje teže živali čim manjše in naj ne presega ± 20 % srednje vrednosti teže.

1.4.1.2 Pogoji bivanja in hranjenja

Uporabljajo se splošni pogoji iz splošnega uvoda dela B, vendar naj bo ciljna vlažnost 50-60 %.

1.4.1.3 Priprava živali

Zdravi mladi odrasli samci se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Kletke se razporedijo tako, da se čimbolj zmanjšajo možni učinki postavitve kletke. Živali se označijo z enkratnimi oznakami. Živali se pred začetkom študije vsaj pet dni aklimatizirajo na laboratorijske razmere.

1.4.1.4 Priprava odmerkov

Trdne preizkušane snovi naj se pred odmerjanjem živalim raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

1.4.2 Preizkusni pogoji

1.4.2.1 Topilo/nosilec

Topilo/nosilec naj nima toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in naj se zanj ne sumi, da kemično reagira s preizkušano snovjo. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadarkoli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca.

1.4.2.2 Kontrolni vzorci

V vsak preizkus naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo/nosilec) kontrolni vzorci. Razen tretiranja s preizkušano snovjo naj se z živalmi v kontrolnih skupinah ravna enako kakor s tistimi v tretiranih skupinah.

Snovi pozitivne kontrole naj pri ravneh izpostavljenosti, pri katerih se pričakuje zaznavno povečanje glede na ozadje, povzročijo strukturne kromosomske aberacije v spermatogonijih *in vivo*.

Odmerki pozitivne kontrole naj se izberejo tako, da so učinki jasni, vendar ne razkrijejo takoj identitete kodiranih mikroskopskih preparatov. Sprejemljivo je, da se snovi pozitivne kontrole dajejo živalim drugače kakor preizkušana snov in da se pri pozitivni kontroli vzorci le enkrat. Poleg tega se lahko uporabijo

kemikalije pozitivne kontrole, ki sodijo v isto skupino nevarnosti kakor preizkušana kemikalija, kadar so na voljo. Primeri snovi pozitivne kontrole vključujejo:

Snov	Št. CAS	Št. EINECS
ciklofosfamid	50-18-0	200-015-4
ciklofosfamid monohidrat	6055-19-2	
cikloheksilamin	108-91-8	203-629-0
mitomicin C	50-07-7	200-008-6
monomerni akrilamid	79-06-1	201-173-7
trietilenmelamin	51-18-3	200-083-5

Negativni kontrolni vzorci, tretirani le s topilom ali nosilcem, drugače pa obravnavani enako kakor tretirane skupine, naj se vključijo v vsako vzorčenje, razen če pretekli kontrolni podatki dokazujejo sprejemljivo spremenljivost med posameznimi živalmi in pogostnost celic s kromosomskimi aberacijami. Uporabijo naj se tudi netretirani kontrolni vzorci, razen če pretekli ali objavljeni kontrolni podatki dokazujejo, da izbrano topilo/nosilec ne povzroča škodljivih ali mutagenih učinkov.

1.5 POSTOPEK

1.5.1 Število živali

Vsaka tretirana in kontrolna skupina mora vključevati vsaj pet samcev, ki jih je mogoče analizirati.

1.5.2 Program tretiranja

Preizkušane snovi se po možnosti dajo enkrat ali dvakrat (tj. kot en vnos ali kot dva vnosa). Preizkušane snovi se lahko dajo tudi v razdeljenem odmerku, tj. dva vnosa v istem dnevu, ne več kakor nekaj ur naražen, da se olajša dajanje velikega volumna materiala. Drugačni režimi odmerjanja naj bodo znanstveno utemeljeni.

Pri skupini z največjim odmerkom se vzorci vzamejo dvakrat po tretiranju. Ker preizkušana snov lahko vpliva na dinamiko celičnega ciklusa, se vzorci vzamejo enkrat zgodaj, približno 24 ur po tretiranju, in drugič pozno, približno 48 ur po tretiranju. Pri drugih odmerkih naj se vzorci vzamejo 24 ur ali 1,5 dolžine celičnega ciklusa po tretiranju, razen če je znano, da so drugi časi vzorčenja primernejši za zaznavanje učinkov (6).

Lahko se vzamejo dodatni vzorci ob drugih časih. Na primer pri kemikalijah, ki bi lahko povzročile zaostajanje kromosomov ali učinke, neodvisne od faze S, bi bilo lahko primerno vzorčiti bolj zgodaj (1).

Ustreznost programa ponovljenega tretiranja je treba določiti za vsak primer posebej. Po ponovljenem programu tretiranja naj se živali žrtvujejo 24 ur (1,5 dolžine celičnega ciklusa) po zadnjem vnosu. Lahko se vzamejo dodatni vzorci ob drugih časih, kadar je to primerno.

Pred žrtvovanjem se živalim intraperitonealno injicira ustrezen odmerek snovi za ustavitev metafaze (npr. Colcemida® ali kolhicina). Živali se vzorčijo v ustreznem časovnem intervalu po tem. Pri miših je ta interval približno 3-5 ur, pri kitajskih hrčkih pa približno 4-5 ur.

1.5.3 Velikost odmerkov

Če se opravi študija za ugotavljanje območja, ker ni na voljo ustreznih podatkov, naj se opravi v istem laboratoriju, na isti vrsti in sevu ter ob enakem režimu tretiranja, kakor bo to uporabljeno v glavni študiji (7). Pri toksičnosti se za prvo vzorčenje uporabijo tri velikosti odmerkov. Te velikosti odmerkov naj zajamejo območje od največje toksičnosti do majhne toksičnosti ali netoksičnosti. Pri poznejšem vzorčenju se lahko uporabi le največji odmerek. Največji odmerek je odmerek, ki povzroči takšne znake toksičnosti, da se pričakuje, da bi večji odmerki pri istem režimu odmerjanja povzročili smrt.

Snovi s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih netoksičnih odmerkih (kakor so hormoni in mitogeni) so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerka in naj se ovrednotijo za vsak primer posebej. Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v spermatogonijih (npr. zmanjšanje razmerja med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi; zmanjšanje naj ne bi preseglo 50 %).

1.5.4 Mejni preizkus

Če preizkus pri eni velikosti odmerka vsaj 2 000 mg/kg telesne teže/dan, ki se dá v enem vnosu ali v dveh vnosi v istem dnevu, ne povzroči nobenih opaznih toksičnih učinkov in če se na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh ne pričakuje, da bo snov genotoksična, se lahko pojmuje, da popolna študija z uporabo treh velikosti odmerkov ni potrebna. Pričakovana izpostavljenost človeka lahko nakaže potrebo po večjih odmerkih pri mejnem preizkusu.

1.5.5 Dajanje odmerkov

Navadno se preizkušana snov daje z gavažo po želodčni cevki ali ustrezni intubacijski kanili ali z intraperitonealno injekcijo. Sprejemljivi so tudi drugi načini izpostavljanja, kadar se lahko utemeljijo. Največji volumen tekočine, ki se lahko naenkrat dá z gavažo ali injekcijo, je odvisen od velikosti preizkusne živali. Volumen naj ne presega 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih volumnov je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih snoveh, ki bodo navadno povzročile dražilne učinke pri večjih koncentracijah, naj se s prilagoditvijo koncentracije čimbolj zmanjša spremenljivost preizkusnega volumna, tako da se zagotovi stalni volumen pri vseh velikostih odmerkov.

1.5.6 Priprava kromosomov

Takoj po žrtvovanju se iz enega ali obeh mod pridobijo celične suspenzije, se izpostavijo hipotonični raztopini in fiksirajo. Celice se nato nanesejo na objektna stekelca in obarvajo.

1.5.7 Analiza

Pri vsaki živali naj se analizira vsaj 100 dobro vidnih metafaz (tj. najmanj 500 metafaz na skupino). To število celic se lahko zmanjša, kadar se opazi veliko število aberacij. Vsi preparati, skupaj s pozitivnimi in negativnimi kontrolnimi vzorci, naj se pred mikroskopsko analizo neodvisno kodirajo. Ker fiksiranje pogosto povzroči pretrganje dela metafaz in izgubo kromosomov, naj bo število centromer v štetih celicah enako $2n \pm 2$.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Podatki za posamezne živali naj bodo prikazani v tabeli. Poskusna enota je žival. Za vsako žival naj se določi število celic s strukturnimi kromosomskimi aberacijami in število kromosomskih aberacij na celico. Različni tipi strukturnih kromosomskih aberacij naj se navedejo s svojimi števili in pogostnostjo za tretirane in kontrolne skupine. Presledki se evidentirajo ločeno in navedejo v poročilu, vendar se na splošno ne vključijo v skupno pogostnost aberacij.

Če se opazujeta mitoza, pa tudi mejoza, naj se določi razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi kot merilo citotoksičnosti za vse tretirane živali in živali negativne kontrole v celem vzorcu 100 delečih se celic na žival, da se ugotovijo možni citotoksični učinki. Če se opazuje le mitoza, naj se določi mitotični indeks v vsaj 1 000 celicah za vsako žival.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Pozitivni rezultat se lahko določi na podlagi številnih meril, kakor je na primer z odmerkom povezano povečanje relativnega števila celic s kromosomskimi aberacijami ali jasno povečanje števila celic z aberacijami v posamezni tretirani skupini ob posameznem vzorčenju. Najprej naj se preuči biološka pomembnost rezultatov. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode (8). Statistična značilnost naj ne bo edini odločilni dejavnik za pozitivni odziv. Dvourni rezultati naj se razjasnijo z dodatnimi preizkusi, po možnosti ob prilagojenih poskusnih pogojih.

Pojmuje se, da preizkušana snov, pri kateri rezultati ne izpolnjujejo navedenih meril, ni mutagena v tem preizkusu.

Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvourni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultati preizkusa kromosomskih aberacij v spermatogonijih *in vivo* pomenijo, da preizkušana snov povzroča strukturne kromosomske aberacije v kličnih celicah preizkusne vrste. Negativni rezultati pomenijo, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ne povzroča kromosomskih aberacij v kličnih celicah preizkusne vrste.

Obravnava naj se verjetnost, da preizkušana snov ali njeni metaboliti dosežejo tarčno tkivo.

3. POROČANJE

POROČILO O PREIZKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

- utemeljitev izbire nosilca,
- topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Preizkusne živali:

- uporabljena vrsta/sev,
- število in spol živali,
- vir, pogoji bivanja, prehrana itn.,
- teža posameznih živali na začetku preizkusa, skupaj z območjem telesne teže, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom za vsako skupino.

Preizkusni pogoji:

- podatki študije za ugotavljanje območja, če je bila opravljena,
- razlogi za izbiro velikosti odmerka,
- razlogi za način dajanja,
- podrobnosti o pripravi preizkušane snovi,
- podrobnosti o dajanju preizkušane snovi,
- razlogi za čas žrtvovanja,

- način preračunavanja koncentracije preizkušane snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je to primerno,
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode,
- podroben opis programov tretiranja in vzorčenja,
- metode merjenja toksičnosti,
- vrsta snovi za ustavitev metafaze, njena koncentracija in čas tretiranja,
- metode priprave mikroskopskih preparatov,
- merila za štetje aberacij,
- število analiziranih celic na žival,
- merila za določitev, ali je študija pozitivna, negativna ali dvoumna.

Rezultati:

- znaki toksičnosti,
- mitotični indeks,
- razmerje med mitozami spermatogonijev v prvi in drugi mejotski metafazi,
- tip in število aberacij, navedena za vsako žival posebej,
- skupno število aberacij na skupino,
- število celic z aberacijami na skupino,
- odvisnost med odmerkom in odzivom, če je to mogoče,
- statistične analize, če so bile opravljene,
- podatki o sočasni negativni kontroli,
- podatki o pretekli negativni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,
- podatki o sočasni pozitivni kontroli,
- spremembe v ploidnosti, če so bile opažene.

Diskusija rezultatov.

Sklepi.

4. LITERATURA

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

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

PRILOGA 4G

„B.39. PREIZKUS NENAČRTNE SINTEZE DNA (UDS) V JETRNH CELICAH SESALCEV IN VIVO**1. METODA**

Ta metoda ustreza metodi OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 UVOD

Namen preizkusa nenačrtne sinteze DNA (UDS) v jetrnih celicah sesalcev *in vivo* je določiti preizkušane snovi, ki sprožijo popravljanje DNA v jetrnih celicah tretiranih živali (1), (2), (3), (4).

Ta preizkus *in vivo* je metoda za preiskovanje genotoksičnih učinkov kemikalij na jetra. Izmerjena končna točka kaže na poškodbe in posledično popravljanje DNA v jetrnih celicah. Jetra so navadno glavno področje presnove absorbiranih spojin. Zato so primerno mesto za merjenje poškodb DNA *in vivo*.

Če obstajajo dokazi, da preizkušana snov ne bo dosegla tarčnega tkiva, ta preizkus ni primeren.

Končna točka preizkusa nenačrtne sinteze DNA (UDS) se meri z določanjem sprejema označenih nukleozidov v celicah, v katerih ne poteka načrtna (faza S) sinteza DNA. Najpogosteje uporabljena tehnika je avtoradiografsko določanje sprejema timidina, označenega s tritijem (^3H -TdR). Za preizkuse UDS *in vivo* se po možnosti uporabljajo jetra podgan. Namesto jeter se lahko uporabijo druga tkiva, vendar ta niso predmet te metode.

Zaznavanje odziva UDS je odvisno od števila baz DNA, ki se izrežejo in zamenjajo na mestu poškodbe. Zato je preizkus UDS posebej koristen za zaznavanje popravljanja dolgih delov (20 do 30 baz), ki ga povzroči snov. Popravljanje kratkih delov (ena do tri baze) se zazna z mnogo manjšo občutljivostjo. Poleg tega mutageni pojavi lahko nastanejo zaradi nepopravljanja, napačnega popravljanja ali napačnega podvojevanja lezij DNA. Velikost odziva UDS ne da nobenih podatkov o točnosti popravljanja. Možno je tudi, da mutagen reagira z DNA, a se poškodbe DNA ne popravijo s popravljanjem z izrezovanjem. Pomanjkanje specifičnih informacij o mutagenem delovanju pri preizkusu UDS se nadomesti s potencialno občutljivostjo te končne točke, ker se meri v celotnem genomu.

Glej tudi splošni uvod dela B.

1.2 DEFINICIJE

Celice v popravljanju: neto število jedrnih zrn (NNG), večje od vnaprej določene vrednosti, utemeljene v laboratoriju, ki opravlja preizkus.

Neto število jedrnih zrn (NNG): kvantitativno merilo za UDS aktivnost v celici pri avtoradiografskih preizkusih UDS, ki se izračuna tako, da se povprečno število citoplazemskih zrn v jedru enakovrednih območjih citoplazme (CG) odšteje od števila jedrnih zrn (NG): $\text{NNG} = \text{NG} - \text{CG}$. Število NNG se izračuna za posamezne celice in nato združi za celice v kulturi, v vzporednih kulturah itn.

Nenačrtna sinteza DNA (UDS): popravljalna sinteza DNA po izrezu in odstranitvi dela DNA, na katerem je poškodba, ki jo povzročijo kemične snovi ali fizikalni dejavniki.

1.3 PRINCIP PREIZKUSNE METODE

Preizkus UDS v jetrnih celicah sesalcev *in vivo* kaže na popravljalno sintezo DNA po izrezu in odstranitvi dela DNA, na katerem je poškodba, ki jo povzročijo kemične snovi ali fizikalni dejavniki. Preizkus navadno temelji na vključitvi ^3H -TdR v DNA jetrnih celic, v katerih je majhna pogostnost celic v fazi S celičnega ciklusa. Sprejem ^3H -TdR se navadno določi z avtoradiografijo, ker ta tehnika ni tako dovzetna za motnje, ki jih povzročajo celice v fazi S, kakor je to na primer metoda tekočinske scintilacije.

1.4 OPIS METODE

1.4.1 **Priprave**1.4.1.1 *Izbor živalske vrste*

Navadno se uporabljajo podgane, lahko pa se uporabi katera koli primerna vrsta sesalcev. Uporabijo naj se splošno uporabljani laboratorijski sevi mladih zdravih odraslih živali. Ob začetku študije naj bo nihanje teže živali čim manjše in naj ne presega ± 20 % srednje vrednosti teže za vsak spol.

1.4.1.2 *Pogoji bivanja in hranjenja*

Uporabljajo se splošni pogoji iz splošnega uvoda dela B, vendar naj bo ciljna vlažnost 50 do 60 %.

1.4.1.3 *Priprava živali*

Zdrave mlade odrasle živali se naključno dodelijo kontrolni in tretirani skupini. Kletke se razporedijo tako, da se čimbolj zmanjšajo možni učinki postavitve kletke. Živali se označijo z enkratnimi oznakami in se pustijo v kletkah vsaj pet dni pred začetkom študije, da se aklimatizirajo na laboratorijske razmere.

1.4.1.4 *Preizkušana snov/priprava*

Trdne preizkušane snovi naj se pred odmerjanjem živalim raztopijo ali suspendirajo v ustreznih topilih ali nosilcih, in če je to primerno, se razredčijo. Tekoče preizkušane snovi se lahko odmerijo neposredno ali pa se pred odmerjanjem razredčijo. Uporabljajo naj se sveže pripravljene preizkušane snovi, razen če podatki o stabilnosti kažejo, da je shranjevanje sprejemljivo.

1.4.2 **Preizkusni pogoji**1.4.2.1 *Topilo/nosilec*

Topilo/nosilec naj nima toksičnih učinkov pri uporabljenih odmerkih in naj se zanj ne sumi, da kemično reagira s preizkušano snovjo. Če se uporabijo manj poznana topila/nosilci, naj njihovo vključitev podpirajo podatki, ki kažejo na njihovo združljivost. Priporoča se, da se, kadarkoli je to mogoče, kot prva možnost preuči uporaba vodnega topila/nosilca.

1.4.2.2 *Kontrolni vzorci*

V vsak samostojno izveden del preizkusa naj se vključijo sočasni pozitivni in negativni (topilo/nosilec) kontrolni vzorci. Razen tretiranja s preizkušano snovjo naj se z živalmi v kontrolni skupini ravna enako kakor s tistimi v tretiranih skupinah.

Snovi pozitivne kontrole naj bodo snovi, za katere se ve, da povzročijo UDS, če se dajejo pri ravneh izpostavljenosti, pri katerih se pričakuje zaznavno povečanje glede na ozadje. Snovi pozitivne kontrole, pri katerih je potrebna aktivacija presnove, naj se uporabljajo v odmerkih, ki povzročijo zmeren odziv (4). Odmerki naj se izberejo tako, da so učinki jasni, vendar ne razkrijejo takoj identitete kodiranih mikroskopskih preparatov. Primeri snovi pozitivne kontrole vključujejo:

Čas vzorčenja	Snov	Št. CAS	Št. Eines
Zgodnja vzorčenja (2 do 4 ure)	dimetil nitrozamin	62-75-9	200-249-8
Pozna vzorčenja (12 do 16 ur)	N-2-fluorenilacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Lahko se uporabijo druge ustrezne snovi pozitivne kontrole. Sprejemljivo je, da se snovi pozitivne kontrole dajejo živalim drugače kakor preizkušana snov.

1.5 POSTOPEK**1.5.1 Število in spol živali**

Uporabi naj se zadostno število živali, da se upošteva naravno biološko nihanje odziva na preizkus. V vsaki skupini naj bodo vsaj tri živali, ki jih je mogoče analizirati. Če že obstaja obsežna baza preteklih podatkov, sta za sočasne negativne in pozitivne kontrolne skupine potrebni le ena ali dve živali.

Če so v času študije na voljo podatki študij o isti vrsti in ob uporabi istega načina izpostavljanja, ki dokazujejo, da med spoloma ni znatnih razlik v toksičnosti, bo zadostovalo preizkušanje na enem spolu, po možnosti na samcih. Kadar bi bila lahko izpostavljenost kemikaliji pri človeku omejena na en spol, na primer pri nekaterih farmacevtskih učinkovinah, naj se preizkus opravi na živalih ustreznega spola.

1.5.2 Program tretiranja

Preizkušane snovi se navadno dajejo z enkratnim vnosom.

1.5.3 Velikost odmerkov

Navadno se uporabljata vsaj dve velikosti odmerkov. Največji odmerek je odmerek, ki povzroči takšne znake toksičnosti, da se pričakuje, da bi večji odmerki pri istem režimu odmerjanja povzročili smrt. V splošnem naj bo manjši odmerek 50 do 25 % večjega odmerka.

Snovi s specifičnim biološkim delovanjem pri majhnih netoksičnih odmerkih (na primer hormoni in mitogeni) so lahko izjeme pri merilih za določanje odmerka in naj se ovrednotijo za vsak primer posebej. Če se opravi študija za ugotavljanje območja, ker ni na voljo ustreznih podatkov, naj se opravi v istem laboratoriju, na isti vrsti, sevu in spolu ter ob enakem režimu tretiranja, kakor bo to uporabljeno v glavni študiji.

Največji odmerek se lahko opredeli tudi kot odmerek, ki povzroči nekaj znakov toksičnosti v jetrih (npr. piknotična jedra).

1.5.4 Mejni preizkus

Če preizkus pri eni velikosti odmerka vsaj 2 000 mg/kg telesne teže, ki se dá v enem vnosu ali v dveh vnosih v istem dnevu, ne povzroči nobenih opaznih toksičnih učinkov in če se na podlagi podatkov o strukturno sorodnih snoveh ne pričakuje, da bo snov genotoksična, popolna študija morda ne bo potrebna. Pričakovana izpostavljenost človeka lahko nakaže potrebo po večjih odmerkih pri mejnem preizkusu.

1.5.5 Dajanje odmerkov

Navadno se preizkušana snov dá z gavažo po želodčni cevki ali ustrezni intubacijski kanili. Sprejemljivi so tudi drugi načini izpostavljanja, kadar se lahko utemeljijo. Vendar intraperitonealni način ni priporočljiv, ker jetra lahko izpostavi preizkušani snovi neposredno in ne prek krvnožilnega sistema. Največji volumen tekočine, ki se lahko naenkrat dá z gavažo ali injekcijo, je odvisen od velikosti preizkusne živali. Volumen naj ne presega 2 ml/100 g telesne teže. Uporabo večjih volumnov je treba utemeljiti. Razen pri dražilnih ali jedkih snoveh, ki bodo navadno povzročile dražilne učinke pri večjih koncentracijah, naj se s prilagoditvijo koncentracije čimbolj zmanjša spremenljivost preizkusnega volumna, tako da se zagotovi stalni volumen pri vseh velikostih odmerkov.

1.5.6 Priprava jetrnih celic

Jetrne celice tretiranih živali se navadno pripravijo 12 do 16 ur po odmerjanju. Navadno je potrebno dodatno, zgodnejše vzorčenje (ponavadi dve do štiri ure po tretiranju), razen če se po 12 do 16 urah pokaže jasen pozitiven odziv. Lahko se vzorči tudi ob drugih časih, kadar je to utemeljeno s podatki o toksikokineti.

Navadno se pripravijo kratkotrajne kulture jetrnih celic sesalcev, tako da se jetra perfundirajo *in situ* s kolagenazo in se sveže odcepljenim jetrnim celicam omogoči, da se pritrdijo na ustrezno podlago. Jetrne celice živali negativne kontrole naj imajo sposobnost preživetja (5) vsaj 50 %.

1.5.7 Določanje UDS

Sveže izolirane sesalske jetrne celice se primerno dolgo, na primer tri do osem ur, inkubirajo, navadno v gojišču, ki vsebuje ^3H -TdR. Po končani inkubaciji se gojišče odstrani s celic, ki se nato lahko inkubirajo v gojišču s presežkom neoznačenega timidina, da se zmanjša nevgrajena radioaktivnost (cold chase). Celice se nato sperejo, fiksirajo in posušijo. Pri daljši inkubaciji 'cold chase' morda ne bo potreben. Mikroskopski preparati se pomočijo v avtoradiografsko emulzijo, se izpostavijo v temi (npr. hranijo se v hladilniku 7 do 14 dni), se razvijejo in pobarvajo, nato se preštejejo izpostavljena srebrna zrnca. Za vsako žival se pripravi dva do trije preparati.

1.5.8 Analiza

Mikroskopski preparati naj vsebujejo dovolj celic z normalno morfologijo, da je omogočeno smiselno ocenjevanje UDS. Preparati se mikroskopsko pregledajo, da se poiščejo znaki očitne citotoksičnosti (npr. piknoza, zmanjšana raven radioaktivnih označevalcev).

Mikroskopski preparati naj se kodirajo pred štetjem zrn. Navadno se v štetje vključi 100 celic za vsako žival z vsaj dveh preparatov; štetje manj kakor 100 celic/žival naj bo utemeljeno. Število zrn se ne določa za jedra v fazi S, lahko pa se evidentira delež celic v fazi S.

Količina ^3H -TdR, vgrajenega v jedra in citoplazmo morfološko normalnih celic, kar dokazuje nalaganje srebrnih zrn, naj se določi z ustreznimi metodami.

2. PODATKI

2.1 OBDELAVA REZULTATOV

Navedejo se podatki za posamezne mikroskopske preparate in živali. Poleg tega naj bodo vsi podatki povzeti v tabeli. Izračuna naj se neto število jedrnih zrn (NNG) za vsako celico, vsako žival ter vsak odmerik in čas, tako da se od števila NG odšteje število CG. Če se preštevajo celice v popravljanju, 'naj bodo merila za določanje celic v popravljanju' utemeljena in zasnovana na podatkih pretekle ali sočasne negativne kontrole. Numerični rezultati se lahko ovrednotijo s statističnimi metodami. Če se uporabijo statistični testi, naj se izberejo in utemeljijo pred začetkom študije.

2.2 VREDNOTENJE IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Primeri meril za pozitivne/negativne odzive vključujejo:

pozitivne (i) vrednosti NNG, večje od poprej določenega praga, ki je utemeljen na podlagi preteklih podatkov laboratorija;

ali (ii) vrednosti NNG, znatno večje kakor pri sočasni kontroli;

negativne (i) vrednosti NNG, v območju preteklega kontrolnega praga ali pod njim;

ali (ii) vrednosti NNG, ne znatno večje kakor pri sočasni kontroli.

Preuči naj se biološka pomembnost rezultatov: to pomeni, naj se upoštevajo parametri, kakor so razlike med živalmi, odvisnost med odmerkom in odzivom ter citotoksičnost. Pri vrednotenju rezultatov preizkusa se kot pomoč lahko uporabijo statistične metode. Vendar pa naj statistična značilnost ne bo edini odločilni dejavnik za pozitivni odziv.

Čeprav bo večina poskusov dala jasne pozitivne ali negativne rezultate, bodo v redkih primerih dobljeni podatki preprečili zanesljivo oceno o delovanju preizkušane snovi. Rezultati lahko ostanejo dvomni ali dvomljivi ne glede na število ponovitev poskusa.

Pozitivni rezultat preizkusa UDS z jetrnimi celicami sesalcev *in vivo* pomeni, da preizkušana snov povzroča poškodbe DNA v jetrnih celicah sesalcev *in vivo*, ki se lahko popravijo z nenačrtno sintezo DNA *in vitro*. Negativni rezultat pomeni, da preizkušana snov pri preizkusnih pogojih ne povzroča poškodb DNA, ki se lahko zaznajo s tem preizkusom.

Obravnava naj se verjetnost, da preizkušana snov doseže krvni obtok ali posebej tarčno tkivo (npr. sistemska toksičnost).

3. POROČANJE

POROČILO O PREIZKUSU

Poročilo o preizkusu mora vsebovati naslednje informacije:

Topilo/nosilec:

- utemeljitev izbire nosilca,
- topnost in stabilnost preizkušane snovi v topilu/nosilcu, če sta znani.

Preizkusne živali:

- uporabljena vrsta/sev,
- število, starost in spol živali,
- vir, pogoji bivanja, prehrana itn.,
- teža posameznih živali na začetku preizkusa, skupaj z območjem telesne teže, srednjo vrednostjo in standardnim odklonom za vsako skupino.

Preizkusni pogoji:

- pozitivni in negativni (nosilec/topilo) kontrolni vzorci,
- podatki študije za ugotavljanje območja, če je bila opravljena,
- razlogi za izbiro velikosti odmerka,
- podrobnosti o pripravi preizkušane snovi,
- podrobnosti o dajanju preizkušane snovi,
- razlogi za način dajanja,
- metode za preverjanje, ali je preizkušana snov dosegla krvni obtok ali tarčno tkivo, če je to primerno,
- način preračunavanja koncentracije preizkušane snovi v hrani/pitni vodi (ppm) v dejanski odmerek (mg/kg telesne teže/dan), če je to primerno,
- podrobnosti o kakovosti hrane in vode,
- podroben opis programov tretiranja in vzorčenja,
- metode merjenja toksičnosti,
- metoda priprave in kultiviranja jetrnih celic,
- uporabljena avtoradiografska tehnika,

- število pripravljenih mikroskopskih preparatov in število celic, upoštevanih pri štetju,
- merila vrednotenja,
- merila za določitev, ali je študija pozitivna, negativna ali dvoumna.

Rezultati:

- srednja vrednost števila jedrnih zrn, števila citoplazemskih zrn in neto števila jedrnih zrn za posamezne mikroskopske preparate, živali in skupine,
- odvisnost med odmerkom in odzivom, če je na voljo,
- statistična ocena, če je na voljo,
- znaki toksičnosti,
- podatki o sočasni negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli,
- podatki o pretekli negativni (topilo/nosilec) in pozitivni kontroli, z območji, srednjimi vrednostmi in standardnimi odkloni,
- število celic v popravljanju, 'če je bilo določeno,'
- število celic v fazi S, če je bilo določeno,
- sposobnost preživetja celic.

Diskusija rezultatov

Sklepi

4. LITERATURA

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

PRILOGA 5

Glej: Direktiva Komisije 2001/59/ES, UL L 225, 21.8.2001, str. 1.

PRILOGA 6

„PRILOGA IX

DEL A

Določbe o zapiralih, varnih za otroke

Poleg določb iz člena 22(1)(e) te direktive velja, da so posode katere koli kapacitete, v katerih so snovi, ki pomenijo nevarnost aspiracije (Xn; R65) ter so razvrščene in označene v skladu z odstavkom 3.2.3 Priloge VI k tej direktivi, razen snovi, danih v promet v obliki aerosolov ali v posodah z zatesnjenim nastavkom za razprševanje, opremljene z zapirali, varnimi za otroke.

1. Embalaža za večkratno zapiranje

Zapirala, varna za otroke, ki se uporabljajo na embalaži za večkratno zapiranje, morajo biti v skladu s standardom ISO 8317 (izdaja z dne 1. julija 1989) ‚Zapirala, varna za otroke — zahteve in metode za preizkušanje embalaže za večkratno zapiranje‘, ki ga je sprejela Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO).

2. Embalaža za enkratno zapiranje

Zapirala, varna za otroke, ki se uporabljajo na embalaži za enkratno zapiranje, morajo biti v skladu s standardom CEN EN 862 (izdaja iz marca 1997) ‚Embalaža — embalaža, varna za otroke — zahteve in preizkusni postopki za embalažo za enkratno zapiranje za nefarmacevtske izdelke‘, ki ga je sprejel Evropski odbor za standardizacijo (CEN).

3. Opombe

1. Skladnost z zgoraj navedenimi standardi lahko potrdijo le laboratoriji, usklajeni z evropskimi standardi skupine EN 45 000.

2. Posebni primeri

Če je očitno, da je embalaža dovolj varna za otroke, ker ti ne morejo priti do vsebine brez orodja, preizkusa ni treba opraviti.

Pri vseh drugih primerih in kadar je dovolj razlogov za dvom o varnosti zapirala za otroke, lahko nacionalni organ od osebe, odgovorne za dajanje izdelka v promet, zahteva potrdilo laboratorija o skladnosti iz točke 3.1, v katerem je navedeno bodisi:

— da je zapiralo takšne vrste, da preizkusi po zgoraj navedenih standardih ISO in CEN niso potrebni, bodisi

— da je bilo zapiralo preizkušeno in je bilo ugotovljeno, da je v skladu z zgoraj navedenimi standardi.

DEL B

Določbe o otipnih opozorilih

Tehnične specifikacije za otipna opozorila so v skladu s standardom EN ISO 11683 (izdaja iz leta 1997) ‚Embalaža — otipna opozorila na nevarnost — zahteve‘.
