32000L0032

L 136/1 *EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA* 8.6.2000

KOMISJONI DIREKTIIV 2000/32/EÜ,

19. mai 2000,

millega kohandatakse kahekümne kuuendat korda tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta (*)

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 27. juuni 1967. aasta direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta, ([1]) viimati muudetud Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga 1999/33/EÜ, ([2]) eriti selle artiklit 28,

ning arvestades järgmist:

(1) Direktiivi 67/548/EMÜ I lisa sisaldab ohtlike ainete loetelu koos iga aine liigitamise ja märgistamise üksikasjadega. Praegused teadus- ja tehnikaalased teadmised on näidanud, et kõnealuses lisas sisalduvat ohtlike ainete loetelu tuleks kohandada. Direktiivi teatavaid keeleversioone on vaja parandada eessõna ja I lisa tabeli A konkreetsetes punktides.

(2) Direktiivi 67/548/EMÜ III lisa sisaldab ohtlikele ainetele ja valmististele omistatud konkreetsete ohtude laadile osutavate lausete loetelu. Direktiivi 67/548/EMÜ IV lisa sisaldab ohtlikke aineid ja valmistisi käsitlevale ohutusteabele osutavate lausete loetelu. Direktiivi 67/548/EMÜ VI lisa sisaldab ohtlike ainete ja valmististe liigitamise ja märgistamise juhendit. Direktiivi teatavaid keeleversioone on vaja parandada III, IV ja VI lisa konkreetsetes punktides.

(3) Direktiivi 67/548/EMÜ V lisas on sätestatud ainete ja valmististe füüsikalis-keemiliste omaduste, toksilisuse ja ökotoksilisuse määramise meetodid. Kõnealust lisa on vaja kohandada tehnika arenguga.

(4) Direktiivi 67/548/EMÜ IX lisa sisaldab lapsele avamatute kinnitustega seotud sätteid. Neid sätteid tuleks kohandada ja ajakohastada. Lapsele avamatute kinnituste kasutamise ulatust on vaja suurendada.

(5) Käesolevas direktiivis sätestatud meetmed on kooskõlas ohtlike ainete ja valmististe tehniliste kaubandustõkete kõrvaldamist käsitlevaid direktiive tehnika arenguga kohandava komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Käesolevaga muudetakse direktiivi 67/548/EMÜ järgmiselt.

1. I lisa muudetakse järgmiselt.

   a) Käesoleva direktiivi lisa 1A märkus Q asendab eessõna vastava märkuse.

   b) Käesoleva direktiivi lisa 1B read asendavad tabeli A vastavad read.

   c) Käesoleva direktiivi lisa 1C kanded asendavad vastavad kanded.

   d) Käesoleva direktiivi lisa 1D kanded lisatakse.

2. Käesoleva direktiivi lisa 2 riskilause asendab III lisa vastava lause.

3. IV lisa muudetakse järgmiselt.

   a) Käesoleva direktiivi lisa 3A ohutuslaused asendavad IV lisa vastavad laused.

(*) Vastu võetud pärast kahekümne seitsmendat kohandamist.
([1]) EÜT 196, 16.8.1967, lk 1.
([2]) EÜT L 199, 30.7.1999, lk 57.

b) Käesoleva direktiivi lisa 3B ohutuse ühendlaused asendavad IV lisa vastavad laused.

4. V lisa B osa muudetakse järgmiselt:

a) Käesoleva direktiivi lisa 4A tekst asendab peatükki B.10.

b) Käesoleva direktiivi lisa 4B tekst asendab peatükki B.11.

c) Käesoleva direktiivi lisa 4C tekst asendab peatükki B.12.

d) Käesoleva direktiivi lisa 4D tekst asendab peatükke B.13 ja B.14.

e) Käesoleva direktiivi lisa 4E tekst asendab peatükki B.17.

f) Käesoleva direktiivi lisa 4F tekst asendab peatükki B.23. Vastavalt muudetakse ka selgitava märkuse peatüki B.23 pealkirja.

g) Käesoleva direktiivi lisa 4G tekst lisatakse.

5. V lisa C osa üldise sissejuhatuse neljas taane kustutatakse.

6. Käesoleva direktiivi lisa 5 tekst asendab VI lisa vastava teksti.

7. IX lisa muudetakse vastavalt käesoleva direktiivi lisas 6 sätestatule.

Artikkel 2

1. Liikmesriigid jõustavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud õigus- ja haldusnormid hiljemalt 1. juuniks 2001. Nad teatavad sellest viivitamata komisjonile.

Kui liikmesriigid need sätted vastu võtavad, lisavad nad nendesse või nende ametliku avaldamise korral nende juurde viite käesolevale direktiivile. Sellise viitamise viisi näevad ette liikmesriigid.

2. Liikmesriigid edastavad komisjonile käesoleva direktiiviga reguleeritavas valdkonnas nende poolt vastuvõetud siseriiklikud põhilised õigusnormid ning käesoleva direktiivi ja vastuvõetud siseriiklike normide vahelise vastavustabeli.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv jõustub kolmandal päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Ühenduste Teatajas*.

Artikkel 4

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 19. mai 2000

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Margot WALLSTRÖM

LISA 1A

I LISA EESSÕNA

Ainete kindlaksmääramise, liigitamise ja märgistamisega seotud märkuste selgitus

DA:

Märkus 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:

Märkus 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.

(Ei kehti ES teksti kohta)

(Ei kehti DE teksti kohta)

(Ei kehti EL teksti kohta)

(Ei kehti EN teksti kohta)

(Ei kehti FR teksti kohta)

(Ei kehti IT teksti kohta)

(Ei kehti NL teksti kohta)

(Ei kehti PT teksti kohta)

(Ei kehti FI teksti kohta)

LISA 1B

TABEL A

Z	Sümbol	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	Gadolínio	Gadolinium”

LISA 1C

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
006-011-00-7	karbarüül (ISO) 1-naftüülmetüülkarbamaat		200-555-0	63-25-2	Kants. 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	metaamnaatrium (ISO) naatriummetüülditiokarbamaat		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	diuroon (ISO) 3-(3,4-diklorofenüül)-1,1-dimetüüluurea		206-354-4	330-54-1	Kants. Kat. 3; R40 Mutag. Kat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-48/22-5053 S: (2-)13-22-23-37-46-60-61		
006-016-00-4	propoksuur (ISO) 2-isopropoksüfenüül-*N*-metüülkarbamaat2-isopropoksüfenüülmetüülkarbamaat		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-metüül-2-(metüültio)propanaal-*O*-(*N*-metüülkarbamoüül)oksiim		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-dimetüülamino-3-tolüülmetüülkarbamaat		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	diallaat (ISO) *S*-(2,3-dikloroallüül)-*N*,*N*-diisopropüültiokarbamaat		218-961-1	2303-16-4	Kants. 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	barbaan (ISO) 4-klorobut-2-ünüül-*N*-(3-klorofenüül)karbamaat		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	merkaptodimetuur (ISO) metiokarb 3,5-dimetüül-4-metüültiofenüül-*N*-metüülkarbamaat		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	proksaan-naatrium (ISO) naatrium-*O*-isopropüülditiokarbamaat		205-443-5	140-93-2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-51/53 S: (2-)13-61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
006-026-00-9	karbofuraan (ISO) 2,3-dihüdro-2,2-dimetüülbensofuraan-7-üül-*N*-metüülkarbamaat		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	dinobutoon (ISO) 2-(1-metüülpropüül)-4,6-dinitrofenüül-isopropüülkarbonaat		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-dioksolaan-2-üül)fenüül-*N*-metüülkarbamaat		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	metoksuroon (ISO) 3-(3-kloro-4-metoksüfenüül)-1,1-dimetüül-uurea		243-433-2	19937-59-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
006-034-00-2	pebulaat (ISO) *N*-butüül-*N*-etüül-*S*-propüültiokarbamaat		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-dimetüül-2dimetüülaminopürimidiin-4-üül-*N*,*N*-dimetüülkarbamaat		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-isopropüül-5-metüülfenüül-*N*-metüülkarbamaat		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	sulfallaat (ISO) 2-kloroallüüldimetüülditiokarbamaat	E	202-388-9	95-06-7	Kants. Kat. 2; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61		
006-039-00-X	triallaat (ISO) *S*-2,3,3-trikloroallüüldiisopropüültiokarbamaat		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	monuroon (ISO) 3-(4-klorofenüül)-1,1-dimetüüluurea		205-766-1	150-68-5	Kants. 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	monuroon-TCA 3-(4-klorofenüül)-1,1-dimetüülurooniumtrikloroatsetaat		-	140-41-0	Xi; R36/38 Kants. Kat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-40-50/53 S: (2-)3637-60-61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
006-045-00-2	metomüül (ISO) 1-(metüültio)etülideenamino-*N*-metüülkarbamaat		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-dimetüül-1,3-bensodioksool-4-üül-*N*-metüülkarbamaat		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) 3-(1-metüülbutüül)fenüül-*N*-metüülkarbamaadi ja 3-(1-etüülpropüül) fenüül-*N*-metüükarbamaadi segu		-	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-(etüültiometüül)fenüül-*N*-metüülkarbamaat		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	fenuroon-TCA 1,1-dimetüül-3-fenüülurooniumtri-kloroatsetaat		-	4482-55-7	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)60-61		
006-053-00-6	isoprokarb (ISO) 2-isopropüülfenüül-*N*-metüülkarbamaat		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	meksakarbaat (ISO) 3,5-dimetüül-4-dimetüülaminofenüül-*N*-metüülkarbamaat		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	nitrapüriin (ISO) 2-kloro-6-trikloormetüülpüridiin		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	oksükarboksiin (ISO) 2,3-dihüdro-6-metüül-5-(*N*-fenüülkarba-moüül)-1,4-oksoti-iin-4,4-dioksiid		226-066-2	5259-88-1	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)61		
006-069-00-3	metüültiofanaat (ISO) 1,2-di-(3-metoksükarbonüül-2-tioureido)benseen		245-740-7	23564-05-8	Mutag. Kat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
006-070-00-9	furmetsükloks *N*-tsükloheksüül-*N*-metoksü-2,5-dimetüül-3-furamiid		262-302-0	60568-05-0	Kants. Kat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
006-088-00-7	benfurakarb (ISO) etüül-*N*-[2,3-dihüdro-2,2-dimetüül-bensofuraan-7-üüloksükarbonüül (metüül)aminotio]-*N*-isopropüül-*β*-alaninaat		-	82560-54-1	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61		
007-012-00-5	*N*,*N*-dimetüülhüdrasiin 1,1-dimetüülhüdrasiin	E	200-316-0	57-14-7	F; R11 Kants. 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	*N*,*N*-dimetüülhüdrasiin 1,2-dimetüülhüdrasiin	E	-	540-73-8	Kants. 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	vesinikfluoriidhape … %	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	metüülasiinfoss (ISO) *O*,*O*-dimetüül-4-oksobensotriasiin-3-üülmetüülditiofosfaat		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	fentioon (ISO) *O*,*O*-dimetüül-*O*-(4-metüültio-*m*-tolüül)tiofosfaat		200-231-9	55-38-9	Mutag. 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-)36/37-45-60-61		
015-056-00-1	etüülasiinfoss (ISO) *O*,*O*-dietüül-4-oksobensotriasiin-3-üülmetüülditiofosfaat		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	triasofoss (ISO) *O*,*O*-dietüül-*O*-1-fenüül-1 *H*, 2,4-triasool-3-üültiofosfaat		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-)36/37-45-60-61		
016-013-00-X	vääveldikloriid		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	

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
016-014-00-5	vääveltetrakloriid		-	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	dimetüülsulfaat	E	201-058-1	77-78-1	Kants. Kat. 2; R45 Mutag. Kat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43 S: 53-45	C ≥ 25 %: T+; R45-25-26-34-43 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-22-26-34-43 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-22-26-36/37/38-43 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-22-23-36/37/38-43 3 % ≤ C < 5 %: T; R45-22-23-43 1 % ≤ C < 3 %: T; R45-23-43 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
016-024-00-X	dimeksaan (ISO) bis(metoksütiokarbonüül)disulfiid		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	trinaatrium-3-amino-6,13-dikloro-10-((3-((4-kloro-6-(2-sulfofenüülamino)-1,3,5-triasiin-2-üül)amino)propüül)amino)- 4,11-trifenoksüdioksasiindisulfonaat		410-130-3	136248-03-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
022-001-00-5	titaantetrakloriid		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	dimetüültsink [1] dietüültsink [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	tsüheksatiin (ISO) hüdroksütritsükloheksüülstannaan tri(tsükloheksüül)tinahüdroksiid		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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
050-012-00-5	tetratsükloheksüülstannaan [1] klorotritsükloheksüülstannaan [2] butüültritsükloheksüülstannaan [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	fenbutatiinoksiid (ISO) bis(tris(2-metüül-2-fenüülpropüül)tina)oksiid		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	pliisulfokromaatkollane C. I. Pigment Yellow 34 [See aine on identifit-seeritud värviatlases toodud värvusindeksiga CI 77603.]		215-693-7	1344-37-2	Kants. 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	pliikromaatmolübdaatsulfaatpunane C. I. Pigment Red 104 [See aine on identifit-seeritud värviatlases toodud värvusindeksiga CI 77605.]		235-759-9	12656-85-8	Kants. 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	kumeen [1] propüülbenseen [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	benso[*a*]püreen benso[*def*]krüseen		200-028-5	50-32-8	Kants. Kat.2; R45 Mutag. 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	benso[*e*]atsefeenantrüleen		205-911-9	205-99-2	Kants. Kat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
602-035-00-2	1,4-diklorobenseen *p*-diklorobenseen		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-jodopropeen allüüljodiid		209-130-4	556-56-9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7-26-45		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
603-076-00-9	but-2-üün-1,4-diool 2-butüün-1,4-diool		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	*exo*-1-metüül-4-(1-metüületüül)-7-oksabi-tsüklo[2.2.1]heptaan-2-ool		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	*exo*-(+/-)-1-metüül-4-(1-metüületüül)-2-[(2-metüülfenüül)metoksü]-7-oksabitsüklo [2.2.1]heptaan		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''-nitrilotripropaan-2-ool triisopropanoolamiin		204-528-4	122-20-3	Xi; R36 R52-53	Xi R:36-52/53 S: (2-)26-61		
603-117-00-0	propaan-2-ool isopropüülalkohol 2-propanool		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	bifenüül-2-ool 2-hüdroksübifenüül 2-fenüülfenool (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	2-fenüülfenool, naatriumsool naatrium-2-bifenülaat		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'-isobutüületülideendifenool (alt.): 2,2-bis(4'-hüdroksüfenüül)-4-metüülpentaan		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	atsifluorofeen [1] atsifluorofeen-naatrium [2] 5-[2-kloro-4-(trifluorometüül)fenoksü]-2-nitrobensoehape [1] naatrium-5-[2-kloro-4-(trifluorometüül)fenoksü]-2-nitrobensoaat [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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
604-043-00-1	monobensoon 4-hüdroksüfenüülbensüüleeter hüdrokinoonmonobensüüleeter		203-083-3	103-16-2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25-26-37		
604-044-00-7	mekvinool 4-metoksüfenool hüdrokinoonmonometüüleeter		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	glüoksaa l … % etaandiaal … %	B	203-474-9	107-22-2	Mutag. 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	pindoon (ISO) 2-pivaloüülindaan-1,3-dioon		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	dikloon (ISO) 2,3-dikloro-1,4-naftokinoon		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	klorodekoon (ISO) perkloropentatsüklo[5,3,0,$0^{2,6}$,$0^{3,9}$,$0^{4,8}$]dekaan-5-oon dekakloropentatsüklo[5,2,1,$0^{2,6}$,$0_{3,9}$,$0^{5,8}$]dekaan-4-oon		205-601-3	143-50-0	Kants. 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	metribusiin (ISO) 4-amino-6-*tert*-butüül-3-metüültio-1,2,4-triasiin-5(4H)-oon 4-amino-4,5-dihüdro-6-(1,1-dimetüületüül)-3-metüültio-1,2,4-triasiin-5-oon		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	kloridasoon (ISO) 5-amino-4-kloro-2-fenüülpüridasiin-3-(2*H*)-oonpürasoon		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	kinometionaat kinometionaat (ISO) 6-metüül-1,3-ditiolo(4,5-*b*)kinoksaliin-2-oon		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	triadimefoon (ISO) 1-(4-klorofenoksü)-3,3-dimetüül-1-(1,2,4-triasool-1-üül)butanoon		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
606-044-00-2	2,4,6-trimetüülbensofenoon		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-metoksübensoehape 3,6-dikloro-2-metoksübensoehape		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	kumakloor (ISO) 3-[1-(4-klorofenüül)-3-oksobutüül)]-4-hüdroksükumariin		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	kumafurüül (ISO) fumariin (*R,S*)-3-(1-(2-furüül)-3-oksobutüül)-4-hüdroksükumariin 4-hüdroksü-3-[3-okso-1-(2-furüül)butüül]kumariin		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	kelevaan (ISO) etüül-5-(perkloro-5-hüdroksüpentatsüklo(5,3,0,$0^{2,6}$,$0^{3,9}$,$0^{4,8}$) dekaan-5-üül)-4-oksopentanoaat etüül-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-dekakloro-4-hüdroksüpentatsüklo(5,2,1,$0^{2,6}$,$0^{3,9}$,$0^{5,8}$) dets-4-üül)-4-oksovaleraat		-	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	benseen-1,2,4-trikarboksüülhappe 1,2-anhüdriidtrimelliitanhüdriid		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	palderjanhape		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-triklorobensoehape		200-026-4	50-31-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
607-153-00-8	benasoliin (ISO) 4-kloro-2,3-dihüdro-2-okso-1,3-bensotiasool-3-üüläädikhape		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	klorofensoon (ISO) 4-klorofenüül-4-klorobenseensulfonaat		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	kloroäädikhappe naatriumsool naatriumkloroatsetaat		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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
607-159-00-0	klorobensülaat (ISO) etüül-2,2-di(4-klorofenüül)-2-hüdroksüatsetaat etüül-4,4'-diklorobensülaat		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	Segu: *α*-3-(3-(2 *H*-bensotriasool-2-üül)-5-*tert*-butüül-4-hüdroksüfenüül)propionüül-*ω*-hüdroksüpolü(oksüetüleen);*α*-3-(3-(2*H*-bensotriasool-2-üül)-5-tert-butüül-4-hüdroksüfenüül)propionüül-*ω*-3-(3-(2H-bensotriasool-2-üül)-5-*tert*-butüül-4-hüdroksüfenüül)propionüüloksüpolü(oksüetüleen)		400-830-7	-	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		
607-188-00-9	naatriumvesinik-*N*-karboksülaatetüül-*N*-oktadets-9-enüülmaleamaat		402-970-4	-	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24/37-61		
607-209-00-1	Segu: *O*,*O*-di(1-metüületüül)tritio-bistioformiaat;*O*,*O*-di(1-metüületüül) tetratio-bis-tioformiaat;*O*,*O*-di (1-metüületüül)pentatio-bistioformiaat		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	etüül-3,3-bis[1,1-dimetüülpropüül) peroksü]butüraat		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-etoksüetüül-2-[4-(2,6-dihüdro-2,6-diokso-7-fenüül-1,5-dioksaindatseen-3-üül)fenoksü] atsetaat		403-960-2	-	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
607-243-00-7	naatrium-3,6-dikloro-*o*-anisaat [1] 3,6-dikloro-*o*-aniishape, 2,2'-imino dietanoolühend (1:1) [2] 3,6-dikloro-*o*-aniishape, 2-aminoetanoolühend (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: 5253 S: 61		
607-248-00-4	naptalaamnaatrium naatrium-*N*-naft-1-üülftalamaat		205-073-4	132-67-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
607-249-00-X	(1-metüül-1,2-etaandiüül)bis[oksü(metüül-2,1-etaandiüül)diakrülaat tripropüleenglükooldiakrülaat TPGDA		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-tsübalotbriin (ISO) 1:1 segu (*S*)-*α*-tsüano-3-fenoksübensüül-(*Z*)-(1*R*)-*cis*-3-(2-kloro-3,3,3-trifluoropropenüül)-2,2-dimetüültsüklopropaankarboksülaadist ja (*R*)-*α*-tsüano-3-fenoksübensüül-(*Z*)-(1 *S*)-*cis*-3-(2-kloro-3,3,3-trifluoropropenüül)-2,2-dimetüültsüklopropaankarboksülaadist		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	fluroksüpüür (ISO) 4-amino-3,5-dikloro-6-fluoro-2-püridüüloksüäädikhape		-	69377-81-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
608-003-00-4	akrüülnitriil	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Kants. 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-ditsüano-2,3,5,6-tetra-klorobenseen		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-*tert*-butüül-4,6-dinitrofenool	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	nitrofeen (ISO) 2,4-diklorofenüül-4-nitrofenüüleeter	E	217-406-0	1836-75-5	Kants. 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	teknaseen (ISO) 1,2,4,5-tetrakloro-3-nitrobenseen		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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
611-008-00-4	4-aminoasobenseen 4-fenüülasoaniliin		200-453-6	60-09-3	Kants. Kat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
611-013-00-1	triliitium-1-hüdroksü-7-(3-sulfonatoaniliin)-2-(3-metüül-4-(2-metoksü-4-(3-sulfonato fenüülaso)fenüülaso)naftaleen-3-sulfonaat		403-650-7	117409-78-6	E; R2 N; R51-53	E; N R: 2-51/53 S: (2-)35-61		
611-065-00-X	4,4'-(4-iminotsükloheksa-2,5-dienülideen metüleen)dianiliinvesinikkloriid C. I. Basic Red 9		209-321-2	569-61-9	Kants. Kat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-035-00-4	2-metoksüaniliin *o*-anisidiin	E	201-963-1	90-04-0	Kants. Kat. 2; R45 Mutag. Kat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25 S: 53-45		
612-042-00-2	bensidiin 1,1'-bifenüül-4,4'-diamiin 4,4'-diaminobifenüül bifenüül-4,4'-üleendiamiin	E	202-199-1	92-87-5	Kants. 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'-diaminodifenüülmetaan 4,4'-metüleendianiliin	E	202-974-4	101-77-9	Kants. Kat. 2; R45 Mutag. 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	4,4'-bi-*o*-toluidiini soolad 3,3'-dimetüülbensidiini soolad *o*-tolidiini soolad	A E	210-322-5 265-294-7 277-985-0	612-82-8 64969-36-4 74753-18-7	Kants. Kat. 2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		
612-099-00-3	4-metüül-*m*-fenüleendiamiin 2,4-tolueendiamiin	E	202-453-1	95-80-7	Kants. 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-piperasiin-1-üületüülamiin		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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
612-111-00-7	2-metüül-*m*-fenüleendiamiin 2,6-tolueendiamiin		212-513-9	823-40-5	Mutag. 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-metüül-*p*-fenüleendiamiin 2,5-tolueendiamiin		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	flumetraliin (ISO) *N*-(2-kloro-6-fluorobensüül)-*N*-etüül-*α, α, α*-trifluoro-2,6-dinitro-*p*-toluidiin		-	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	diaminotolueen	E	246-910-3	25376-45-8	Kants. 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	morfamkvaat (ISO) 1,1'-bis-(3,5-dimetüülmorfolinokarbonüül metüül)-4,4'-bipüridiiliumioon		-	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	sümkloseen trikloroisotsüanuurhape trikloro-1,3,5-triasiintrioon		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-fenüül-1,3,5-triasiin-2,4-diüüldiamiin 6-fenüül-1,3,5-triasiin-2,4-diamiin bensoguanamiin		202-095-6	91-76-9	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)61		
613-042-00-5	imasaliil (ISO) 1-[2-(allüüloksü)-2-(2,4-diklorofenüül)etüül]-1*H*-imidasool		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	imasaliilsulfaat (ISO) 1-[2-(allüüloksü)etüül-2-(2,4-diklorofenüül)]-1*H*-imidasooliumvesiniksulfaat [1] (±)-1-[2-(allüüloksü)etüül-2-(2,4-dikloro fenüül)]-1*H*-imidasooliumvesiniksulfaat [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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
613-066-00-6	terbumetoon (ISO) 2-*tert*-butüülamino-4-etüülamino-6-metoksü-1,3,5-triasiin		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	morfamkvaatdikloriid [1] morfamkvaatsulfaat [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*-oktüül)-2-pürrolidoon		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	heksakonasool (ISO) (*RS*)-2-(2,4-diklorofenüül)-1-(1*H*-1,2,4-triasool-1-üül)heksaan-2-ool		-	79983-71-4	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-131-00-9	pürokviloon (ISO) 1,2,5,6-tetrahüdropürrool[3,2,1-*ij*]kinoliin-4-oon		-	57369-32-1	Xn; R22 R52-53	Xn R:22-52/53 S: (2-)61		
613-134-00-5	müklobutaniil (ISO) 2-(4-klorofenüül)-2-(1*H*-1,2,4-triasool-1-üülmetüül)heksaannitriil		-	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	metabenstiasuroon (ISO) 1-(1,3-bensotiasool-2-üül)1,3-dimetüüluurea		242-505-0	18691-97-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-139-00-2	metüülmetsulfuroon metüül-2-(4-metoksü-6-metüül-1,3,5-triasiin-2-üülkarbamoüülsulfamoüül)bensoaat		-	74223-64-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
614-001-00-4	nikotiin (ISO) 3-(*N*-metüül-2-pürrolidinüül)püridiin		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	brutsiin 2,3-dimetoksostrühniin		206-614-7	357-57-3	T+; R26/28 R52-53	T R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
614-007-00-7	brutsiinsulfaat [1] brutsiinnitraat [2] strühnidiin-10-oon, 2,3-dimetoksü-, mono[(R)-1-metüülheptüül-1,2-benseen dikarboksülaat] [3] strühnidiin-10-oon, 2,3-dimetoksü-, (*S*)-mono(1-metüülheptüül-1,2-benseen-dikarboksülaadi ühend (1:1) [4]		225-432-9 [1] 227-317-9 [2] 269-439-5 [3] 269-710-8 [4]	4845-99-2 [1] 5786-97-0 [2] 68239-26-9 [3] 68310-42-9 [4]	T+; R26/28 R52-53	T+ R: 26/28-52/53 S: (1/2-)13-45-61		
615-006-00-4	2-metüül-*m*-fenüleendiisotsüanaat [1] 4-metüül-*m*-fenüleendiisotsüanaat [2] *m*-tolülideendiisotsüanaat [3] tolueen-2,6-diisotsüanaat [1] tolueen-2,4-diisotsüanaat [2] tolueendiisotsüanaat [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]	Kants. 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-)23-36/37-45-61	C ≥ 20 %: T+R26-36/37/38-40-42/43 7 % ≤ C < 20 %: T+ R26-40-42/43 1 % ≤ C < 7 %: T R23-40-42/43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn R20-42	2
616-010-00-9	naatriumtosüülkloroamiid		204-854-7	127-65-1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22-31-34-42 S: (1/2-)7-22-26-36/37/39-45		
616-033-00-X	pürakarboliid (ISO) 3,4-dihüdro-6-metüül-2 *H*-püraan-5-karboksamiid		246-419-4	24691-76-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-035-00-5	tsümoksaniil 2-tsüano-*N*-[(etüülamino)karbonüül]-2-(metoksüimino)atsetamiid		261-043-0	57966-95-7	Xn; R22 R43 N R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-60-61		
617-004-00-9	1,2,3,4-tetrahüdro-1-naftüülhüdroperoksiid		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*-dimetüülbensüül)peroksiid		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	dibensoüülperoksiid bensoüülperoksiid		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	klorodimeform (ISO) N^2-(4-kloro-*o*-tolüül)-N^1,N^1-dimetüülformamidiin		228-200-5	6164-98-3	Kants. Kat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-40-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Aine-tega seotud märku-sed	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmis-tistega seotud märku-sed
650-008-00-9	drasoksoloon (ISO) 4-(2-klorofenüülhüdrasoon)-3-metüül-5-isoksasoloon		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	klorodimeformvesinikkloriid *N*'-(4-kloro-*o*-tolüül)-*N*,*N*-dimetüülformamidiinmonovesinikkloriid N^2-(4-kloro-*o*-tolüül)-N^1,N^1-dimetüülformamidiinvesinikkloriid		243-269-1	19750-95-9	Kants. 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	esfenvaleraat (ISO) (*S*)-*α*-tsüano-3-fenoksübensüül-(*S*)-2-(4-klorofenüül)-3-metüülbutüraat		-	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	triasulfuroon (ISO) 1-[2-(2-kloroetoksü)fenüülsulfonüül]-3-(4-metoksü-6-metüül-1,3,5-triasiin-2-üül)uurea		-	82097-50-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

LISA 1D

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
006-090-00-8	2-(3-iodoprop-2-üün-1-üüloksü)-etüülfenüülkarbamaat		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	1,3-diheks-5-een-1-üül-1,1,3,3-tetrametüüldisiloksaani ja 1,3-diheks-n-een-1-üül-1,1,3,3-tetra-metüüldisiloksaani segu		406-490-6	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-164-00-9	Kaltsium-P, P'-(1-hüdroksüetüleen)bis-(vesinikfosfonaat)-dihüdraat		400-480-5	36669-85-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		
015-165-00-4	Tiobis(4,1-fenüleen)-S, S, S′,S'-tetrafenüüldisulfooniumbisheksa-fluorofosfaadi ja difenüül(4-fenüül-tiofenüül) sulfooniumheksafluorofosfaadi segu		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-tert-butüül-4-metüül-fenoksü)-2,4,8,10-tetraoksa-3,9-difosfospiro[5.5] undekaan		410-290-4	80693-00-1	R53	R: 53 S: 61		
015-167-00-5	3-(hüdroksüfenüül-fosfinüül)propioonhape		411-200-6	14657-64-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601-050-00-1	Benseen, C_{10-13}-alküülderivaadid		267-051-0	67774-74-7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601-051-00-7	4-fenüülbut-1-een		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	Pentabromodifenüül-eeter		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-fluoroetaan		404-080-1	1717-00-6	N; R52-53-59	N R: 52/53-59 S: 59-61		
603-128-00-0	2-(fenüülmetoksü)-naftaleen		405-490-3	613-62-7	R53	R: 53 S: 61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
603-129-00-6	1-tert-butoksü-propaan-2-ool		406-180-0	57018-52-7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603-130-00-1	α-((dimetüül)bifenüül)-ω-hüdroksüpolü (oksüetüleeni) isomeeride segu		406-325-8	-	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)39-61		
603-131-00-7	3:1 segu 1-deoksü-1-[metüül-(1-oksodo detsüül)-amino]-D-glütsidool; 1-deoksü-1-[metüül-(1-oksotetradetsüül)-amino]-D-glütsidool		407-290-1	-	Xi; R41	Xi R:41 S: (2-)26-39		
603-132-00-2	2-hüdroksümetüül-9-metüül-6-(1-metüületüül)-1,4-dioksaspiro-[4.5]dekaan		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	3-[(4-amino-2-kloro-5-nitrofenüül)amino]-propaan-1,2-diool;3,3'-(2-kloro-5-nitro-1,4-fenüleendiimino)bis-(propaan-1,2-diool)		408-240-1	-	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-36-61		
603-134-00-3	Segu dodetsüül ja/või tetradetsüül, difenüüleetrite aseainetest. Aine on toodetud Friedel Crafti reaktsioonil, katalüsaator on eraldatud. Difenüüleeter on asendatud C1-C10 alküülrühmadega. Alküülrühmad on juhuslikult seotud C1 ja C6 vahele. Kasutatakse lineaarseid C12 ja C14,50/50		410-450-3	-	R53	R: 53 S: 61		
603-135-00-9	bis[[2,2',2"-nitrilo-tris[etanolaat]]-1-N,O]-bis[2-(2-metoksüetoksü)-etoksü]titaan		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-hüdroksü-etüül)amino)-2-nitro fenüül)amino)-1-propanool		410-910-3	104226-19-9	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
603-137-00-X	1-deoksü-1-[metüül-(1-oksoheksadetsüül-[amino]-D-glütsidool, 1-deoksü-1-[metüül-(1-oksooktatsüül)-amino]-D-glütsidool		411-130-6	-	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603-138-00-5	3-(2,2-dimetüül-3-hüdroksüpropüül)-tolueen (alt.): 2,2-dimetüül-3-(3-metüüfenüül)-propanool		403-140-4	103694-68-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
604-050-00-X	4-kloro-o-kresool 4-kloro-2-metüülfenool		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C 3 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-tert-butüül-4-hüdroksü)-bensüül)-2,4,6-trimetüülfenool		401-110-5	87113-78-8	R52-53	R: 52/53 S: 61		
604-052-00-0	2,2'-metüleenbis-(6-(2H-bensotriasool-2-üül)-4-(1,1,3,3-tetra-metüülbutüül)fenool)		403-800-1	103597-45-1	R53	R: 53 S: 61		
604-053-00-6	2-metüül-4-(1,1-di-metüületüül)-6-(1-metüül penta-detsüül)fenool		410-760-9	1577661-93-3	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
604-054-00-1	2-metoksü-4-(tetra-hüdro-4-metüleen-2H-püraan-2-üül)fenool,4-(3,6-dihüdro-4-metüül-2H-püraan-2-üül)-2-metoksüfenool		412-020-0	-	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-36-37		
604-055-00-7	2,2'-((3,5',5,5'-tetra-metüül-(1,1'-bifenüül)-4,4'-diüül)-bis-(oksümetüleen))-bis-oksiraan		413-900-7	85954-11-6	Muta. kat. 3; R40	Xn R: 40 S: (2-)22-36-37		
605-027-00-7	3a, 4,5,6,7,7a-heksa-hüdro-4,7-metano-1H-indeen-6-karboksalde-hüüdi ja 3a, 4,5,6,7,7a-heksahüdro-4,7-metano-1H-indeen-5-karboksalde-hüüdi segu		410-480-7	-	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
606-051-00-0	4-pentüültsükloheksa-noon		406-670-4	61203-83-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-052-00-6	4-(N,N-dibutüül-amino)-2-hüdroksü-2'-karboksü-bensofenoon		410-410-5	54574-82-2	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-272-00-5	Fluoroksüpür-meptüül (ISO) [1] fluroksüpür-butometüül (ISO) [2] metüülheptüül, O-((4-amino-3,5-dikloro-6-fluoro-2-püridüüloksü) atsetaat [1] 2-butoksü-1-metüül-etüül, O-(4-amino-3,5-dikloro-6-fluoro-2-püri-düüloksü)atsetaat [2]		279-752-9 [1] -	81406-37-3 [1] 154486-27-8 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
607-273-00-0	ammoonium-7-(2,6-dimetüül-8-(2,2-dimetüülbutürüüloksü)-1,2,6,7,8,8a-heksahüdro-1-naftüül)-3,5-dihüdroksühepto naat		404-520-2	-	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-274-00-6	2-(N-bensüül-N-metüül-amino)etüül-3-amino-2-butenaat		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	Naatriumbensoüül-oksübenseen-4-sulfonaat		405-450-5	66531-87-1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-276-00-7	bis[(1-metüülimidasool)-(2-etüül-heksonaat)], tsingikompleks		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	2-(heksüültio)etüülamiin hüdrokloriidi ja naatriumpropionaadi segu		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	Naatriumfenetüül-naftaleensulfonaadi ja naatriumnaftüül-etüülbenseensulfonaadi isomeeride segu		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	n-oktadetsüülamino-dietüül-bis(vesinikmaleaadi) ja n-okta-detsüülaminodietüül vesinikmaleaat-vesinikftalaadi segu		405-960-8	-	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-280-00-9	Naatrium-4-kloro-1-hüdroksübutaan-1-sulfonaat		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	Hargnenud ja lineaarsete C7-C9 alküül 3-[3-(2H-bensotriasool-2-üül)-5-(1,1-dimetüületüül)-4-hüdroksü-fenüül]propionaatide segu		407-000-3	127519-17-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-282-00-X	2-atseetoksümetüül-4-bensüüloksübut-1-üül atsetaat		407-140-5	131266-10-9	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
607-283-00-5	E-etüül-4-okso-4-fenüülkrotonaat		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	9:1 segu: naatrium-3,3'-(1,4-fenüleenbis-(karbonüülimino-3,1-propaandiüülimino))-bis(10-amino-6,13-dikloro)-4,11-trifenodioksasiindisulfonaat); liitium3,3'-(1,4-fenüleenbis-(karbonüülimino-3,1-propaandiüülimino))-bis(10-amino-6,13-dikloro)-4,11-trifenodioksasiindisulfonaat		410-040-4	136213-76-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-285-00-6	7-(((3-aminofenüül)-sulfonüül)amino)naftaleen-1,3-disulfoon-happe, naatrium7-(((3-aminofenüül)-sulfonüül)amino)nafta-leen-1,3-disulfonaadi ja kaalium7-(((3-amino-fenüül)sulfonüül)-amino)naftaleen-1,3-disulfonaadi segu		410-065-0	-	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-286-00-1	Naatrium/kaalium 7-[[[3-[[4-((2-hüdroksünaftüül)aso)fenüül]aso]-fenüül]sulfonüül]-amino]- naftaleen-1,3-disulfonaadi segu		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'-metüül O-(1-metüül-2-metakrüüloüüloksüetüül)-1,2,3,6-tetra-hüdroftalaat		410-140-8	-	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-288-00-2	Tetranaatrium (c-(3-(1-(3-(e-6-dikloro-5-tsüanopürimidiin-f-üül (metüül)amino)-propüül)-1,6-dihüdro-2-hüdroksü-4-metüül-6-okso-3-püridüülaso)-4-sulfonaatfenüülsulfamoüül)ftalotsüaniin-a, b, d-trisulfonaat(6-)) nikkel (II), milles a on 1 või 2 või 3 või 4, b on 8 või 9 või 10 või 11, c on 15 või 16 või 17 või 18, d on 22 või 23 või 24 või 25 ja kus e ja f on kokku 2 ja 4 või 4 ja 2 vastavalt		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-dimetüülpropüül)-fenoksü)butüülamino-karbonüül-4-hüdroksü-1-naftalenüül)tio)-propioonhape		410-370-9	105488-33-3	R53	R: 53 S: 61		
607-290-00-3	Ammoonium-1-C14-C18-alküüloksükarbonüül-2-(3-allüüloksü-2-hüdroksüprop oksü-karbonüül)etaan-1-sulfonaadi ja ammoonium–2-C14-C18-alküüloksükarbonüül-1-(3-allüüloksü-2-hüdroksüpropoksü-karbonüül)etaan-1-sulfonaadi segu		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	Dodetsüül-ω-(C5/C6-tsükloalküül)alküül karboksülaat		410-630-1	104051-92-5	R53	R: 53 S: 61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
607-292-00-4	[1-(metoksümetüül)-2-(C12-alkoksü)-etoksü]äädikhappe ja [1-(metoksümetüül)-2-(C14-alkoksü)-etoksü]äädikhappe segu		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	N-aminoetüül-piperasoon mono-2,4,6-trimetüül-nonüüldifenüül eeterdisulfonaadi ja N-aminoetüül-piperasoon di-2,4,6-trimetüül-nonüüldifenüül eeterdisulfonaadi segu		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	Naatrium 2-bensoüüloksü-1-hüdroksüetaan-sulfonaat		410-680-4	-	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-295-00-0	Tetranaatrium fosfonoetaan-1,2-dikarboksül aadi ja heksanaatrium fosfonobutaan-1,2,3,4-tetrakarboksülaadi segu		410-800-5	-	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
607-296-00-6	Pentaerütriool tetraestrite, heptaan-happe ja 2-etüülheksaanhappe segu		410-830-9	-	R53	R: 53 S: 61		
607-297-00-1	(E-E)-3,3'-(1,4-fenüleen-dimetülideen), bis(2-oksoboor-10-sul-foonhape)		410-960-6	92761-26-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-298-00-7	2-(trimetüül-ammoonium)etoksü-karboksü benseen-4-sulfonaat		411-010-3	-	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-36/37		
607-299-00-2	Metüül-3-(atsetüültio)-2-metüül-propionaat		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	Trinaatrium-[2-(5-kloro-2,6-difluoro-pürimi diin-4-üülamino)-5-(b-sulfa-moüül-c, d-sulfonaat-ftalotsüaniin-a-üül-K4, N29, N30, N31, N32-sulfonüülamino)-bensoaat(5-)] vask (II); kus 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	Dodekaanhappe ja dodekaanhappe polü(1-7)laktaatestri segu		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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
607-302-00-7	Tetradekaanhappe ja tetradekaanhappe polü(1-7)laktaat estrite segu		411-910-6	-	Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 38-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-303-00-2	1-tsüklopropüül-6,7-difluoro-1,4-dihüdro-4-oksokinoliin-3-karboksüülhape		413-760-7	931077-30-3	Repr kat. 3; R62 R52-53	Xn R: 62-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
608-023-00-3	4-(4-klorofenüül)-2-fenüül-2-[(1H-1,2,4-triasool-1-üül)metüül] butaannitriil		406-140-2	114369-43-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-024-00-9	2-(4-(N-butüül-N-fenetüülamino)-fenüül)etüleen-1,1,2-trikarbonitriil		407-650-8	97460-76-9	R53	R: 53 S: 61		
608-025-00-4	2-nitro-4,5-bis-(bensüüloksü)fenüülatsetonitriil		410-970-0	117568-27-1	R53	R: 53 S: 61		
609-053-00-X	Hüdrasiin-trinitrometaan		414-850-9	-	E; R3 O; R8 Kants kat. 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-furüül)-2-nitroetüleen		406-110-9	35950-52-8	Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-48/22-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
611-043-00-5	2 : 1 : 1 segu: trinaatrium N(1′)-N(2):N(1′)-N(2)-η-6-[2-amino-4-(või 6)-hüdroksü-(või 4-amino-2-hüdroksü)-fenüülaso]-6-(1-karbanüül-2-hüdroksü-prop-1-enüülaso)-5',5′-disulfamoüül-3,3′-disulfonaatbis-(naftaleen-2,1'-aso-benseen-1,2'-diolato-O(1), O(2′))kromaat; trinaatrium N(1′)-N(2):N(1′)-N(2)-η-6,6-bis(1-karbanüül-2-hüdroksüprop-1-enülaas)-5',5′-disulfa-müül-3,3′-disulfo-natobis(naftaleen-2,1'-asobenseen-1,2'-diolato-O(1), O(2′))-kromaat; trinaatrium N(1′)-N(2):N(1′)-N(2)-η-6,6-bis[2-amino-4-(või 6)-hüdroksü-(või 4-amino-2-hüdroksü) fenüülaso]-5',5′-disulfamoüül-3,3′-disulfo naatbis-(naftaleen-2,1'-asobenseen-1,2'-diolato-O(1), O(2′))-kromaat		402-850-1		Xi; R41 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
611-044-00-0	Segu: tert-alküül(C12-C14)-ammoonium-bis[1-[(2-hüdroksü-5-nitrofenüül)aso]-2-naftaleen(2-)]-kromaat-(1-); tert-alküül-(C12-C14)ammoonium-bis[1-[(2-hüdroksü-4-nitrofenüül)-aso]-2-naftaleen(2-)]-kromaat(1-); tertalküül(C12-C14)-ammooniumbis-[1-[[5-(1,1-dimetüül-propüül)-2-hüdroksü-3-nitro fenüül]aso]-2-naftaleen(2-)]-kromaat(1-); tert-alküül(C12-C14)-ammoonium-[[1-[(2-hüdroksü-5-nitrofenüül)aso]-2-naftaleen(2-)]-[1-[(2-hüdroksü-5-nitro-fenüül)aso]-2-naftaleen-(2-)]]-kromaat(1-); tert-alküül(C12-C14)ammoonium-[[1-[[5-(1,1-dimetüül-propüül)-2-hüdroksü-3-nitrofenüül]aso]-2-naftaleen(2-)]-[1-[(2-hüdroksü-5-nitro-fenüül)aso]-2-naftaleen(2-)]]-kromaat(1-); tert-alküül(C12-C14)-ammoonium-((1-(4(või 5)-nitro-2-oksidofenüülaso)-2-naftolaat) (1-(3-nitro-2-oksü-5-pentüülfenüülaso)-2-naftolaat))kromaat(1-)		403-720-7	117527-94-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-045-00-6	2-[4-[N-(4-atseetoksü-butüül)-N-etüül]-amino-2-metüül-fenüülaso]-3-atsetüül-5-nitrotiofeen		404-830-8	-	R53	R: 53 S: 61		
611-046-00-1	4,4'-diamino-2-metüül-asobenseen		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	1 : 1 segu: 2-[[4-[N-etüül-N-(2-atseetoksüetüül)-amino]fenüül]aso]-5,6-diklorobensotiasool; 2-[[4-[N-etüül-N-(2-atseetoksüetüül)-amino]fenüül]-aso]-6,7-dikloro-bensotiasool		407-890-3	111381-11-4	R53	R: 53 S: 61		
611-048-00-2	1 : 1 segu: 2-[[4-[bis(2-atseetoksüetüül)amino]-fenüül]aso]-5,6-dikloro-bensotiasool; 2-[[4-[bis(2-atseetoksü-etüül)amino]fenüül]aso]-6,7-diklorobensotiasool		407-900-6	111381-12-5	R53	R: 53 S: 61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
611-049-00-8	7-[4-(3-dietüülamino propüülamino)-6-(3-dietüül ammoonium propüülamino)-1,3,5-triasiin-2-üülamino]-4-hüdroksü-3-(4-fenüül-asofenüülaso)-naftaleen-2-sulfonaat, äädikhape, piimhape (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-etüül-N-(2-hüdroksü)etüül)amino-2-metüülfenüül)aso-6-metoksü-3-metüül-bensotiasoolkloriide		411-110-7	136213-74-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
611-052-00-4	Naatrium vesi-[5-[[2,4-di-hüdroksü-5-[(2-hüdroksü-3,5-dinitro-fenüül)aso]-fenüül]aso]-2-naftaleen-sulfonaat], rauakompleks		400-720-9	-	R52-53	R: 52/53 S: 61		
612-156-00-2	Triheksadetsüülmetüül-ammooniumkloriidi ja diheksadetsüül-dimetüül ammoonium-kloriidi segu		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-benso[b]tieen-2-üületanoonoksiim-hüdrokloriid		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	bis(5-dodetsüül-2-hüdroksübensald-oksimaat) vase (II) C12-alküülrühm on hargnenud ja 4-dodetsüülsalitsüül-aldoksiimi segu		410-820-4	-	R53	R: 53 S: 61		
612-159-00-9	Trimetüülheksa-metüleen diamiini (2,2,4-trimetüül-1,6-heksaandiamiini ja 2,4,4-trime tüül-1,6-heksaandiamiini segu, EINECS loetletud), Epoksiid 8 (mono[(C10-C16-alküül-oksü)metüül]oksiraani derivaadid) ja p-tolueen-sulfoonhappe reaktsiooniproduktid		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-butüül-5-(4-tert-butüül-(bensüültio)-4-kloro-püridasiin-3(2H)-oon		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'-(piperasiin-1,4-diüül)dipropüül]bis (1H-bensimidaso[2,1-b]-benso[l, m, n][3,8]-fenantroliin-1,3,6-trioon		406-295-6	-	R53	R: 53 S: 61		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
613-151-00-8	1-(3-mesüüloksü-5-tritüüloksümetüül-2-D-treofurüül)tümiin		406-360-9	104218-44-2	R53	R: 53 S: 61		
613-152-00-3	Fenüül N-(4,6-dimetoksüpürimidiin-2-üül)karbamaat		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-trikloropüridiin		407-270-2	16063-70-0	R52-53	R: 52/53 S: 61		
613-154-00-4	2-amino-4-kloro-6-metoksüpürimidiin		410-050-9	5734-64-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613-155-00-X	5-kloro-2,3-difluoro-püridiin		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-butüül-4-kloro-5-formüülimidasool		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-metoksümetüül-pürimidiin		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-dikloro-5-tri-fluorometüül-püridiin		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-dimetüül-etüül)fenüül]etoksü]-kinasoliin		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-metüül-2,5-diasobitsüklo[2.2.1] heptaandihüdrobromiid		411-000-9	125224-62-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615-022-00-1	Metüül-3-isotsüanaatsulfonüül-2-tiofeen-karboksülaat		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		

Indeksi nr	Keemiline nimetus	Ainetega seotud märkused	EÜ nr	CASi nr	Klassifitseerimine	Märgistus	Kontsentratsioonipiirid	Valmististega seotud märkused
615-023-00-7	2-(isotsüanaat-sulfonüülmetüül)-bensoehappe metüül-ester; (alt.): metüül-2-(isotsüanaat-sulfonüülmetüül)-bensoaat		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-etüül-2-hüdroksüfenüül)-2-(3-pentadetsüül-fenoksü)butaanamiid		402-510-2	-	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-045-00-X	2'-(4-kloro-3-tsüano-5-formüül-2-tienüülaso)-5'-dietüülamino-2-metoksüatseetaniliid		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-metüülpürasool-(1,5-b)-1,2,4-triasool-4-üül)propüül)-2-(2,4-di-tert-pentüül-fenoksü)oktaanamiid		406-390-2	-	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-047-00-0	2,2', 2'', 2'''-(etüleen-dinitrilotetrakis-N, N-di(C16)alküülatseet-amiidi ja 2,2', 2'', 2''' -etüleendinitrilotetra-kis-N, N-di(C18) alküülatsetaamide segu		406-640-0	-	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616-048-00-6	3'-trifluorometüül isobutüüraniliid		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-di-metüületüül)fenoksü)-N-(3,5-dikloro-4-etüül-2-hüdroksü-fenüül)heksaan-amiid		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-heksafluoro-propoksü)-fenüülaminokrobonüül]-2,6-difluorobensamiid		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	2,4-bis(N'-(4-metüül-fenüül)-ureido)-tolueeni ja 2,6-bis(N'-(4-metüül-fenüül)-ureido)-tolueeni segu		411-070-0	-	R53	R: 53 S: 61		
617-015-00-9	bis(4-metüülbensoüül)-peroksiid		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	Cyproconazole (ISO) *(2RS, 3RS;2RS, 3SR)*-2-(4-klorofenüül)-3-tsüklopropüül-1-(1H-1,2,4-triasool-1-üül) butaan-2-ool		-	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		

LISA 2

Vt komisjoni direktiiv 2001/59/EÜ, EÜT L 225, 21.8.2001, lk 1.

LISA 3A

Vt komisjoni direktiiv 2001/59/EÜ, EÜT L 225, 21.8.2001, lk 1.

LISA 3B

Vt komisjoni direktiiv 2001/59/EÜ, EÜT L 225, 21.8.2001, lk 1.

LISA 4A

"B.10. MUTAGEENSUS — IMETAJATE KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE *IN VITRO*

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

In vitro kromosoomaberratsioonkatse eesmärgiks on kindlaks määrata ained, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes (1) (2) (3). Struktuursed aberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. Keemiliste mutageenide põhjustatud aberratsioonid on enamuses kromatiidaberratsioonid, aga esineb ka kromosoomaberratsioone. Polüploidsuse suurenemine võib viidata sellele, et kemikaal võib esile kutsuda numbrilisi aberratsioone. Käesolev meetod ei võimalda siiski mõõta numbrilisi aberratsioone ja seda ei kasutata sel eesmärgil korrapäraselt. Kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud on süüdi paljudes inimeste geneetilistes haigustes ja on olemas olulisi tõendeid, et kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud, mis põhjustavad muutusi keharakkude onkogeenides ja kasvaja supressorgeenides, osalevad vähktõve tekkes inimestel ja katseloomadel.

In vitro kromosoommutatsiooni katsetes võib kasutada loodud rakuliinide kultuure, rakutüvesid või primaarsete rakkude kultuure. Kasutatavad rakud valitakse rakkude kasvuvõime, karüotüüpide püsivuse, kromosoomiarvu, kromosoomide mitmekesisuse ja kromosoomaberratsioonide spontaanse sageduse põhjal.

Läbiviidud *in vitro* katsed üldjuhul nõuavad eksogeenset metaboolset aktiveerimist. Kõnealune metaboolse aktiveerimise süsteem ei saa tervenisti jäljendada *in vivo* tingimusi imetajatel. Tuleb hoolt kanda selle eest, et välditakse positiivseid tulemusi põhjustavaid tingimusi, mis ei peegelda looduslikku mutageensust ja võivad tuleneda pH muutustest, osmolaalsusest või tsütotoksilisuse kõrgetest tasemetest (4) (5).

Kõnealust katset kasutatakse imetajate võimalike mutageenide ja kantserogeenide skriinimiseks. Mitmed ühendid, mis annavad kõnealuses katses positiivseid tulemusi, on imetajate kantserogeenid; siiski ei ole kõnealuse katse ja kantserogeensuse vahel täielikku korrelatsiooni. Korrelatsioon sõltub ühendi keemilisest klassist ja üha enam uurimistulemusi viitab sellele, et on olemas kantserogeenid, mida kõnealuse katse abil ei avastata, kuna need näivad mõjuvat muude mehhanismide kui otsese DNA kahjustuse kaudu.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Kromatiidaberratsioon: struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb üksikute kromatiidide katkemises või kromatiididevahelises katkemises ja taasühinemises.

Kromosoomaberratsioon: struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb mõlema kromosoomi katkemises või mõlema kromatiidi samas kohas katkemises ja taasühinemises.

Endoreduplikatsioon: protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-faasi tuum ei lähe mitoosi, vaid algab uus S-faas. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16, … kromatiidi.

Tühik: akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millel on kromatiidide orientatsiooni erinevus minimaalne.

Mitootiline indeks: metafaasis olevate rakkude arv jagatakse rakupopulatsioonis vaadeldud rakkude koguarvuga; näitab rakkude proliferatsiooni astet kõnealuses populatsioonis.

Numbriline aberratsioon: kasutatud rakkude tüüpilisest kromosoomiarvust erinev kromosoomide arv.

Polüploidsus: haploidse kromosoomiarvu (*n*) kordsus, v.a diploidne kromosoomiarv (nt 3*n*, 4*n* jne).

Struktuurne aberratsioon: kromosoomistruktuuri muutus, mis on avastatav raku jagunemise metafaasi etapi mikroskoopilisel uurimisel ja mida täheldatakse deletsiooni ja fragmentidena, kromosoomisiseste või -väliste muutustena.

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Rakukultuurid allutatakse uuritava aine toimele nii metaboolse aktiveerimise tingimustes kui ka ilma selleta. Pärast rakukultuuridele uuritava ainega toimimist töödeldakse neid kindlaksmääratud ajavahemike järel metafaasi peatava ainega (nt Colcemid® või kolhitsiin), rakud kogutakse ja värvitakse ning metafaasis olevaid rakke analüüsitakse mikroskoopiliselt kromosoomaberratsioonide suhtes.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Preparaadid**

1.4.1.1. *Rakud*

Katses võib kasutada erinevaid rakuliine, rakutüvesid või primaarsete rakkude kultuure, sh inimrakke (nt hiina hamstri fibroplaste, inimeste või muude imetajate perifeerse vere lümfotsüüte).

1.4.1.2. *Kasvukeskkonnad ja söötmed*

Rakukultuuride säilitamiseks tuleks kasutada vastavaid kasvukeskkondi ja inkubeerimistingimusi (kasvunõud, CO_2 kontsentratsioon, temperatuur ja niiskus). Püsivaid rakuliine ja -tüvesid tuleb kontrollida regulaarselt modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ning mükoplasma saastumise puudumise suhtes; kui see on saastunud, siis ei tohiks kasutada. Rakkude normaalse rakutsükli kestus ja kasutatavad kasvutingimused peaksid teada olema.

1.4.1.3. *Rakukultuuride valmistamine*

Püsivad rakuliinid ja -tüved: rakud paljundatakse tüvikultuuridest, mis on külvatud kasvukeskkonda sellise tihedusega, et rakukultuurid ei saavuta konfluentsust enne kogumisaega, ja inkubeeritakse 37 °C juures.

Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (nt hepariin) töödeldud täisveri või tervetelt isenditelt saadud eraldatud lümfotsüüdid lisatakse mitogeeni (nt fütohemaglutiniini) sisaldavale kasvukeskkonnale ja inkubeeritakse 37 °C juures.

1.4.1.4. *Metaboolne aktiveerimine*

Rakud allutatakse uuritava aine toimele nii vastava metaboolse aktiveerimissüsteemi olemasolu kui ka puudumise korral. Enimkasutatav süsteem on ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254-ga (6) (7) (8) (9) või fenobarbitooni ja β-naftoflavooni seguga (10) (11) (12) töödeldud näriliste maksast valmistatud postmitokondriaalne osa (S9), millele on lisatud kofaktor.

Tavaliselt kasutatakse postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsioonis 1-10 mahuprotsenti lõplikus katsekeskkonnas. Metaboolse aktiveerimissüsteemi tingimused võivad sõltuda uuritava keemilise aine klassist. Mõnel juhul on vaja kasutada postmitokondriaalse fraktsiooni rohkem kui üht kontsentratsiooni.

Rida meetodeid, sh geneetiliselt muudetud rakuliini loomine, mis ekspresseerivad teatavaid aktiveerimisensüüme, võivad omada endogeense aktiveerimise võimet. Kasutatavate rakuliinide valik peab olema teaduslikult põhjendatud (nt tsütokroom P450 isoensüümi tähtsus uuritava aine metabolismile).

1.4.1.5. *Uuritav aine/preparaat*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne rakkude töötlemist. Vedelad uuritavad ained võib lisada vahetult katsesüsteemidesse ja/või lahjendada enne töötlemist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohiks uuritava ainega astuda keemilisse reaktsiooni ning see peaks sobima rakkude eluvõimelisuse ja S9 aktiivsusega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, siis peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist. Vees ebapüsivate ainete uurimisel kasutatavad orgaanilised lahustid peavad olema veevabad. Vett saab eemaldada molekulaarsõelte lisamisega.

1.4.2.2. *Toimimiseks kasutatavad kontsentratsioonid*

Suurima kontsentratsiooni määramisel on arvestatavad kriteeriumid tsütotoksilisus, lahustuvus katsesüsteemis ning pH või osmolaalsuse muutused.

Tsütotoksilisus määratakse põhikatses kindlaks nii metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta, kasutades sobivaid rakkude puhtuse ja kasvu indikaatoreid, nt konfluentsuse astet, eluvõimeliste rakkude arvu või mitootilist indeksit. Tsütotoksilisust ja lahustuvust võib olla kasulik määrata eelkatses.

Tuleks kasutada vähemalt kolme analüüsitavat kontsentratsiooni. Kui esineb tsütotoksilisust, peaksid need kontsentratsioonid katma vahemiku suurimast kontsentratsioonist vähimani või sellise kontsentratsioonini, mille korral mürgisus puudub; mis tavaliselt tähendab seda, et kontsentratsioonide erinevus üksteisest võib olla mitte rohkem kui vahemikus 2 kuni Ö10 asuv koefitsient korda. Rakkude kogumise ajal peaks suurima kontsentratsiooni korral ilmnema märkimisväärne konfluentsuse astme, rakkude arvu või mitootilise indeksi (kõigi osas rohkem kui 50 %) vähenemine. Mitootiline indeks on üksnes tsütotoksiliste/tsütostaatiliste mõjude kaudne mõõt ja sõltub töötlemisele järgnevast ajast. Mitootilist indeksit tunnustatakse siiski suspensioonkultuuride puhul, milles muude toksilisust mõõtvate vahendite kasutamine võib olla tülikas ja ebapraktiline. Teavet rakutsükli kineetika kohta, nagu näiteks keskmist generatsiooniaega (AGT), tuleks kasutada lisateabena. AGT on siiski üldine keskmine, mis alati ei too esile hilistunud alampopulatsioonide olemasolu, ning isegi keskmise generatsiooniaja kerge pikenemine võib lükata aberratsioonide optimaalse tõestamisaja palju hilisemaks.

Suhteliselt mittetoksiliste ainete puhul peaks suurim testkontsentratsioon olema 5 µl/ml, 5 mg/ml või 0,01 M, sõltuvalt sellest, milline neist on väikseim.

Suhteliselt lahustumatute ainete puhul, mis ei ole lahustumispiirile vastavast kontsentratsioonist madalamatel kontsentratsioonidel toksilised, peaks suurim kasutatud annus olema lahustumispiiri ületav kontsentratsioon viimases kasvukeskkonnas manustamisperioodi lõpus. Mõnedel juhtudel (nt siis, kui toksilisus esineb üksnes madalaimast lahustumatuskontsentratsioonist kõrgematel kontsentratsioonidel), on soovitav katseid teha rohkem kui ühe kontsentratsiooniga, millel on nähtav sadestus. On kasulik hinnata lahustuvust töötlemise alguses ja lõpus, kuna lahustuvus katsesüsteemis muutub töötlemise ajal rakkude, S9-seerumi jms mõjul. Lahustumatust saab avastada palja silmaga. Sadestus ei tohiks mõjutada tulemust.

1.4.2.3. *Negatiivsed ja positiivsed kontrollkatsed*

Igas uuringus kasutatakse paralleelseid positiivseid ja negatiivseid (lahusti või kandjaaine) kontrollkatseid koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta. Kui kasutatakse metaboolset aktiveerimist, käsitletakse positiivse kontrollainena sellist kemikaali, mis eeldab aktiveerimist mutageense reaktsiooni saamiseks.

Positiivsed kontrollkatsed peaksid kasutama tuntud elastogeeni toimimistasemetel, mis ootuspäraselt peaks reprodutseeritavust ja avastatavust suurendama fooniga võrreldes, mis näitab katsesüsteemi tundlikkust.

Kontsentratsioonid positiivsetes kontrollkatsetes valitakse sellised, et mõjud on selged, kuid neist ei ilmne riideris kohe kodeeritud objektiklaaside identsus. Positiivsete kontrollainete näited:

Metaboolse aktiveerimise tingimus	Aine	CASi nr	EINECSi nr
Eksogeense metaboolse aktiveerimise puudumine	Metüül-metaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
	N-etüül-N-nitroso-karbamiid	759-73-9	212-072-2
	Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
	4-nitro-kinoliin-*N*-oksiid	56-57-5	200-281-1
Eksogeense metaboolse aktiveerimise olemasolu	Benso(a)püreen	50-32-8	200-028-5
	Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
	Tsüklofosfamiid monohüdraat	6055-19-2	

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivseid kontrollaineid. Samasse keemiliste ainete klassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist tuleks kaaluda, kui sellised ained on kättesaadavad.

Igal kogumisperioodil võetakse ka negatiivsetest kontrollkatsetest proovid, mis koosnevad üksnes kasvukeskkonnas olevast lahustist või kandjaainest ning mida on töödeldud samal viisil kui kasvukultuure. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollproove, välja arvatud juhul, kui varasemad kontrollandmed näitavad, et valitud lahustil ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.4.3 **Menetlus**

1.4.3.1. *Töötlemine uuritava ainega*

Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava ainega nii metaboolse aktiveerimise süsteemis kui ka ilma selleta. Lümfotsüütide töötlemist alustatakse ligikaudu 48 tundi pärast mitogeenset stimulatsiooni.

1.4.3.2. Tavaliselt tuleks kasutada iga kontsentratsiooni korral paralleelseid kultuure ja see on rangelt soovitatav negatiivsete/lahusti kontrollkultuuride puhul. Kui varasemad andmed näitavad, et paralleelkultuuride vahel on väike erinevus (13) (14), siis võib olla vastuvõetav iga kontsentratsiooni korral ühe kultuuri kasutamine.

Gaasilisi või lenduvaid aineid uuritakse sobiva meetodi abil, näiteks suletud kasvuanumates (15) (16).

1.4.3.3. *Kultuuride kogumisaeg*

Esimeses katses alluvad rakud uuritava aine toimele nii metaboolse aktiveerimise teel kui ka ilma selleta 3–6 tunni jooksul ning proovid võetakse pärast töötlemise algust (12) ajal, mis vastab ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestusele. Kui kõnealusel meetodil saadakse negatiivsed tulemused nii aktiveerimisega kui ka ilma selleta, tehakse uus katse ilma aktiveerimiseta ja töötlemist jätkatakse kuni proovivõtmise hetkeni, mis vastab ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestusele. Teatud keemilisi aineid saab hõlpsamini avastada, kui töötlemis-/proovivõtuaeg on pikem kui 1,5 rakutsüklit. Metaboolse aktiveerimise korral saadud negatiivseid tulemusi tuleb kooskõlastada igal üksikjuhul eraldi. Neil juhtudel, kui negatiivsete tulemuste kooskõlastamist ei peeta vajalikuks, esitatakse põhjendus.

1.4.3.4. *Kromosoomipreparaatide valmistamine*

Rakukultuure töödeldakse Colcemid®-i või kolhitsiiniga tavaliselt 1–3 tundi enne kogumist. Iga rakukultuuri kogutakse ja töödeldakse eraldi kromosoomipreparaatide jaoks. Kromosoomipreparaatide valmistamise alla kuulub rakkude hüpotooniline töötlemine, fikseerimine ja värvimine.

1.4.3.5. *Analüüs*

Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollkatsete omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kui fikseerimismenetlused viivad tihti metafaasis olevate rakkude suhte rikkumiseni ja kromosoomide kaotamiseni, peaksid seega loetud rakud sisaldama tsentromeere koguses, mis vastab modaalarvule ± 2 kõikide rakutüüpide korral. Iga kontsentratsiooni ja kontrollkatse puhul tuleb lugeda vähemalt 200 hästi levinud metafaasi, mis on võrdselt jaotunud paralleelkultuuride vahel, kui neid kasutatakse. Seda arvu saab vähendada, kui täheldatakse palju aberratsioone.

Kuigi katse eesmärk on avastada struktuursed kromosoomaberratsioonid, on tähtis registreerida ka polüploidsus ja endoreduplikatsioon, kui need esinevad.

2. TULEMUSED

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Katseühikuks on rakk, mistõttu hinnatakse nende rakkude protsendimäära, milles on struktuurne kromosoomaberratsioon või struktuursed kromosoomaberratsioonid. Eri tüüpi struktuursed kromosoomaberratsioonid loetletakse koos nende arvukuse ja esinemissagedustega katse- ja kontrollkultuurides. Tühikud (*gaps*) registreeritakse eraldi ja nende kohta antakse teavet, aga üldiselt ei võeta neid aberratsioonide üldsageduse hulka.

Samuti registreeritakse kõikides töödeldud ja negatiivsetes kontrollkultuurides tehtud samaaegsed tsütotoksilisuse mõõtmised peamistes aberratsioonikatsetes.

Tulemused esitatakse iga üksiku kultuuri kohta. Lisaks esitatakse kokkuvõte kõikidest tulemustest tabeli kujul.

Selget positiivset vastust ei ole vaja verifitseerida. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel muudetud katsetingimustes. Vajadust negatiivsete tulemuste kinnitamise järele on arutatud 1.4.3.3. Katse parameetrite muutmist hinnatud tingimuste vahemiku laiendamiseks tuleb arvesse võtta järelkatsetel. Katse parameetrite, mida võidakse muuta, hulka kuuluvad kontsentratsioonivahemik ja metaboolse aktiveerimise tingimused.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

On mitmeid kriteeriume positiivse tulemuse määramiseks, nagu nt kontsentratsioonist sõltuv kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arvu suurenemine või selle reprodutseeruv kasv. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (3) (13). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks.

Polüploidsete rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et katseainel on võime inhibeerida mitoosiprotsessi ja põhjustada numbrilisi kromosoomaberratsioone. Endoreduplitseeritud kromosoome sisaldavate rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav aine võib takistada rakutsükli progressi (17) (18).

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas süsteemis.

Kuigi enamikel katsetel on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud korduskatsete arvust hoolimata.

In vitro kromosoomaberratsiooni katse positiivsed tulemused viitavad sellele, et uuritav aine põhjustab struktuurseid kromosoomaberratsioone imetajate kultiveeritud keharakkudes. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et katsetingimuste põhjal ei põhjusta uuritav aine kromsoomaberratsioone imetajate kultiveeritud keharakkudes.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab hõlmama järgmist teavet:

Lahusti/kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendamine,

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Rakud:

— rakkude tüüp ja allikas,

— karüotüübi omadused ja kasutatava rakutüübi sobivus,

— mükoplasma puudumine, vajaduse korral,

— teave rakutsükli pikkuse kohta,

— veredoonorite sugu, täisveri või eraldatud lümfotsüüdid, kasutatav mitogeen,

— passaažide arv, vajaduse korral,

— rakukultuuri säilitamise meetodid, vajaduse korral,

— kromosoomide modaalarv.

Katsetingimused:

— metafaasi peatav aine, selle kontsentratsioon ja rakule toime kestus,

— kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sh nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud, kui need on olemas,

— kasvukeskkonna koostis, CO_2 kontsentratsioon, vajaduse korral,

— uuritava aine kontsentratsioon,

— lisatud kandjaaine ja uuritava aine maht,

— inkubatsioonitemperatuur,

— inkubatsiooniaeg,

— töötlemise kestus,

— rakutihedus külvamisel, vajaduse korral,

— metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle vastuvõetavuse kriteeriumid,

— positiivsed ja negatiivsed kontrollkatsed,

— objektiklaaside valmistamise meetodid,

— aberratsioonide loendamise kriteeriumid,

— analüüsitud metafaaside arv,

— toksilisuse mõõtmise meetodid,

— kriteeriumid, mille alusel uuringuid liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

— toksilisuse tunnused, nt konfluentsuse aste, rakutsüklit käsitlev teave, rakkude loendused, mitootiline indeks,

— sadestumise tunnused,

— teave kasvukeskkonna pH ja osmolaalsuse kohta, kui see on määratud,

— aberratsioonide, sh tühikute määratlemine,

— kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arv ja kromosoomaberratsioonide tüüp, mis on toodud eraldi iga katse- ja kontrollkultuuri kohta,

— ploidsuse muutused, kui neid esineb,

— doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral,

— võimalikud statistilised analüüsid,

— paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide tulemused,

— varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemik, keskväärtused ja standardhälbed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1–29.

(2) Ishidate, M. Jr. and Sofumi, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: *Progress in Mutation Research*, Vol. 5, Ashby, J. et al., (eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 427–432.

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environs, Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1–175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147–204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297–305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347–364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173–215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Mircrosomal 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, pp. 83–90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix In Vitro, *Mutation Res.*, 66, pp. 277–290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254–induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175–177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A. Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J. Fouts, J. R. Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), In Vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994), Report from Working Group on in *In Vitro Tests* for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241–261.

(13) Richardson, C., Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., (cd) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for In Vitro Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139–149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91–103.

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795–801.

(17) Locke–Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403–413.

(18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362–1364."

LISA 4B

"B.11. MUTAGEENSUS — KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJATE LUUÜDIS *IN VIVO*

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Imetajate *in vivo* kromosoomaberratsioonkatset kasutatakse uuritava aine põhjustatud strukturaalsete kromosoomaberratsioonide avastamiseks imetajate, tavaliselt näriliste luuüdirakkudes (1) (2) (3) (4). Strukturaalsed kromosoomaberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. Polüploidsuse suurenemine võib viidata sellele, et kemikaal võib esile kutsuda numbrilisi aberratsioone. Keemiliste mutageenide põhjustatud aberratsioonid on enamuses kromatiidaberratsioonid, aga esineb ka kromosoomaberratsioone. Kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud põhjustavad paljusid inimeste geneetilisi haigusi ja on olemas olulisi tõendeid selle kohta, et kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud, mis põhjustavad muutusi keharakkude onkogeenides ja kasvaja supressorgeenides, osalevad vähktõve tekkes inimestel ja katseloomadel.

Kõnealuses katses kasutatakse tavaliselt närilisi. Kõnealuses katses on sihtkoeks luuüdi, kuna selle verevarustus on väga rikkalik ja see sisaldab rakupopulatsiooni, mille rakutsükkel on kiire ning mida on kerge isoleerida ja töödelda. Käesoleva meetodi puhul ei kasutata muid liike ega sihtkudesid.

Käesolev kromosoomaberratsioonkatse on eriti oluline mutageensuse ohu hindamisel, kuna see võimaldab arvesse võtta *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA parandamisprotsesside tegureid, kuigi need võivad erineda liigiti ja kudede vahel. *In vivo* katset võidakse samuti kasutada *in vitro* katses avastatud mutageense mõju täiendaval uurimisel.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine või reageerimisvõimeline metaboliit ei pääse sihtkoesse, ei ole sobiv kasutada käesolevat katset.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Kromatiidaberratsioon: strukturaalne kromosoomikahjustus, mis ilmneb üksikute kromatiidide katkemises või kromatiidide vahelises katkemises ja taasühinemises.

Kromosoomaberratsioon: strukturaalne kromosoomikahjustus, mis ilmneb mõlema kromosoomi katkemises või mõlema kromatiidi katkemises ja taasühinemises samas kohas.

Endoreduplikatsioon: protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-perioodi tuum ei lähe mitoosi, vaid algab uus S-periood. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16, … kromatiidi.

Tühik: akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millel on kromatiidide orientatsiooni erinevus minimaalne.

Numbriline aberratsioon: kasutatud rakkude tüüpilisest normaalsest kromosoomiarvust erinev kromosoomide arv.

Polüploidsus: haploidse kromosoomiarvu (*n*) kordsus, v.a diploidne arv (nt 3*n*, 4*n* jne).

Struktuurne aberratsioon: kromosoomistruktuuri muutus, mis on avastav raku jagunemise metafaasi etapi mikroskoopilisel uurimisel ja mida täheldatakse deletsiooni ja fragmentidena, kromosoomisiseste või -väliste muutustena.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Loomad allutatakse uuritava aine toimele, kasutades sobivat toimimisviisi, ja tapetakse sobiva aja möödudes töötlemisest. Enne tapmist töödeldakse loomi metafaasi peatava ainega (nt kolhitsiini või Colcemid® -ga). Seejärel tehakse luuüdirakkudest kromosoomipreparaadid ja need värvitakse ning metafaasi rakkude kromosoomaberratsioone analüüsitakse.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1 **Preparaadid**

1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Tavaliselt kasutatakse rotte, hiiri ja hiina hamstreid, kuigi võib kasutada mis tahes sobivaid imetajate liike. Rakendatakse noorte tervete loomade tavaliselt kasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ±20 % iga soo keskmisest massist.

1.4.1.2. *Pidamis- ja söötmistingimused*

Üldise sissejuhatuse B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi otstarbekas niiskusesisaldus peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. *Loomade ettevalmistamine*

Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul.

1.4.1.4. *Annuste ettevalmistamine*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendada enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatava annuse korral ja ei tohi anda keemilist reaktsiooni uuritava ainega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, siis peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist.

1.4.2.2. *Kontrollkatsed*

Käesolevasse katsesse kaasatakse mõlema sugupoole korral paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollkatsed. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neid ei töödelda uuritava ainega.

Positiivsed kontrollkatsed ei tohiks põhjustada struktuurseid aberratsioone *in vivo* kokkupuutetasemel, mis peaksid põhjustama avastatavat suurenemist fooniga võrreldes. Positiivsete kontrollainete annused valitakse sellised, et mõjud on selged, kuid neist ei ilmne riideris kohe kodeeritud objektiklaaside identsus. On aktsepteeritav, et positiivses kontrollkatses võib kasutada uuritava aine manustamisviisist erinevat viisi ja

proovid võetakse üksnes korra. Samasse keemiliste ainete klassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist võib kaaluda, kui selline aine on kättesaadav. Positiivsete kontrollainete näited:

Aine	CAS nr	EINECS nr
Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
N-etüül-N-nitroso-karbamiid	759-73-9	212-072-2
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
Tsüklofosfamiid monohüdraat	6055-19-2	
Trietüleen-melamiin	51-18-3	200-083-5

Üksnes lahusti või kandjaainega töödeldud või muul katserühmaga sarnasel viisil töödeldud negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse proovid igal proovivõtukorral, välja arvatud siis, kui varasemad kontrollitulemused näitavad vastuvõetavat loomadevahelist varieerumist ja kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude esinemissagedust. Kui negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse üksnes üks proov, on kõige sobivam võtta see esimesel proovivõtukorral. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollproove, välja arvatud juhul, kui varasemad või avaldatud kontrollandmed näitavad, et valitud lahusti/kandjaaine ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.5. MENETLUS

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Nii katse- kui kontrollrühmas on mõlemast soost vähemalt viis analüüsitavat looma. Kui uuringu ajal on kättesaadavad tulemused sama liigi sama vastuvõtlikkuse liini kasutades tehtud uuringute kohta, mille tulemused näitavad, et toksilisuse osas ei ole olulisi erinevusi sugupoolte vahel, siis piisab vaid ühe sugupoolega katsete tegemisest. Kui inimese vastuvõtlikkus kemikaalidele on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse sobivast soost loomadega.

1.5.2. **Katse kava**

Uuritavad ained tuleb eelistatavalt manustada ühekordsete annustena. Uuritavaid aineid võib manustada ka jagatud annustena, näiteks kaks annust ühel päeval kuni mõnetunnise vahega, et hõlbustada suurte ainekoguste manustamist. Muud manustamisrežiimid peaksid olema teaduslikult tõestatud.

Proovid võetakse kahel korral samal päeval pärast manustamist. Näriliste puhul esimene proovivõtuaeg on 1,5 normaalset rakutsüklit (rakutsükkel kestab tavaliselt 12–18 tundi) pärast manustamist. Kuna aeg uuritava aine sissevõtmise ja metabolismi vahel ja selle mõju rakutsükli kineetikale saavad mõjutada kromosoomaberratsiooni avastamise optimaalset aega, on soovitav 24 tundi pärast esimese proovi võtmist koguda hilisem proov. Kui uuritavat ainet antakse kauem kui üks päev, tuleks võtta üks proov pärast viimast manustamist ajal, mis vastab 1,5 normaalse rakutsükli kestusele.

Enne tapmist süstitakse loomade kõhukelmesse sobiv annus metafaasi peatavat ainet (nt Colcemid®–i või kolhitsiini). Loomadelt võetakse seejärel proovid sobiva intervalli järel. Hiirte puhul on see intervall ligikaudu 3–5 tundi; hiina hamstrite korral ligikaudu 4–5 tundi. Rakud kogutakse luuüdist ja neid analüüsitakse kromosoomaberratsioonide tuvastamiseks.

1.5.3. **Annused**

Kui sobivate andmete puudumisel tehakse annuse vahemiku määramiseks uuring, siis tehakse uuring samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamiskava kui põhiuuringus (5). Kui esineb mürgisus, kasutatakse esimeses proovivõtus kolme erinevat annust. Need annused peaksid hõlmama vahemikku suurimast kuni väiksema mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni. Hilisemal proovivõtuajal on vaja kasutada üksnes suurimat annust. Suurim annus on määratletud annusena, mis põhjustab selliseid mürgistusnähte, et samale manustamisrežiimile põhinevate suuremate annusetasemete kasutamine võib põhjustada surma. Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Suurimat annust võidakse samuti määratleda annusena, mis põhjustab mõningaid mürgisusele viitavaid muutusi luuüdis (nt mitootiline indeks väheneb üle 50 %).

1.5.4. **Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehamassi kohta ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt lähedaste ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uuringut vajalikuks. Kauem kestvate uuringute korral on piirannus 2 000 mg/kg kehamassi kohta päevas kuni 14 päeva kestval manustamisel ja 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas, kui manustamine kestab kauem kui 14 päeva. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. **Manustamine**

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil või süstides kõhuõõnde. Samuti võib muid manustamisviise aktsepteerida, kui need on põhjendatud. Vedeliku suurim maht, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehamassi kohta. Suuremate mahtude kasutamine peab olema põhjendatud. Välja arvatud ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

1.5.6. **Kromosoomipreparaat**

Vahetult pärast tapmist kogutakse luuüdi, seda töödeldakse hüpotoonilise lahusega ja fikseeritakse. Seejärel kantakse rakud objektiklaasidele ja värvitakse.

1.5.7. **Analüüs**

Mitootiline indeks tuleks määrata tsütotoksilisuse määrana vähemalt 1 000 rakust looma kohta kõikides katseloomades (sh positiivsed kontrollid) ja töötlemata negatiivsetes kontroll-loomades.

Vähemalt 100 rakku tuleks iga looma puhul analüüsida. Seda arvu saab vähendada, kui täheldatakse palju aberratsioone. Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollkatsete omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kui objektiklaasi valmistamise menetlused viivad tihti metafaasis olevate rakkude suhte rikkumiseni ja kromosoomide kaotamiseni, peaksid seega loendatud rakud sisaldama tsentromeere koguses, mis vastab modaalarvule $2n \pm 2$.

2. **TULEMUSED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabeli kujul. Katseühikuks on loom. Iga looma puhul tuleks hinnata loendatud rakkude arvu, aberratsioonide arvu raku kohta ja struktuurse(te) kromosoomaberratsiooni(de)ga rakkude protsendimäära. Eri tüüpi struktuursed kromosoomaberratsioonid tuleks loetleda koos nende arvukuse ja esinemissagedustega katse- ja kontrollkultuurides. Tühikud (*gaps*) registreeritakse eraldi ja nende kohta antakse teavet, aga üldiselt ei võeta neid aberratsioonide üldsageduse hulka. Kui pole tõestust toime erinevuse kohta sugude vahel, võidakse kombineerida mõlema sugupoole andmed statistiliseks analüüsiks.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse saamiseks on mitmeid kriteeriume, nt kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude suhtelise arvu suurenemine annusest tingituna või kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arvu selge suurenemine ühes annuse rühmas ühel proovivõtuajal. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel.[6] Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel muudetud katsetingimustes.

Polüploidsuse suurenemine võib viidata sellele, et uuritav aine võib esile kutsuda numbrilisi aberratsioone. Endoreduplikatsiooni suurenemine võib viidata sellele, et uuritaval ainel on võime inhibeerida rakutsükli kulgemist (7) (8).

Uuritavat ainet, mille korral saadud tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse käesolevas katses mittemutageenseks aineks.

Kuigi enamikus katsetes saadakse selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad harvadel juhtudel saadud tulemused uuritava aine aktiivsuse kohta kindlate otsuste tegemise. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete arvust sõltumata.

In vivo kromosoomaberratsioonkatsel saadud positiivsed tulemused viitavad sellele, et aine põhjustab kromosoomaberratsioone testitud liikide luuüdis. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et antud katsetingimustes ei põhjusta aine kromosoomaberratsioone testitud liikide luuüdis.

Tõenäosust, et uuritav aine või selle metaboliidid jõuavad üldisesse vereringesse või eriti sihtkoesse (nt süsteemne toksilisus), tuleks arutada.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet:

Kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendamine,

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui see on teada.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved,

— loomade arv, vanus ja sugu,

— päritolu, pidamistingimused, toitumine jne,

— loomade individuaalne mass katse alustamisel, sh kehamassi vahemik, keskväärtused ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

— positiivsed ja negatiivsed (kandjaaine/lahusti) kontrollkatsed,

— annuse vahemiku määramise uuringu andmed, kui need on läbi viidud,

— manustamise tasemete valimispõhimõtted,

— uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad,

— uuritava aine manustamise üksikasjad,

— manustamistee põhjendus,

— meetodid, mis verifitseerivad, et uuritav aine jõuab üldisesse vereringesse või sihtkoesse, vajaduse korral,

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) teisendamine tegelikuks annuseks (mg/kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral,

— üksikasjad toidu- ja veekvaliteedi kohta,

— manustamis- ja proovivõtukavade üksikasjalik kirjeldus,

— toksilisuse mõõtmise meetodid,

— metafaasi peatav aine, selle kontsentratsioon ja töötlemise kestus,

— objektiklaaside ettevalmistamise meetodid,

— aberratsioonide loendamise kriteeriumid,

— analüüsitud rakkude arv looma kohta,

— kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

— toksilisuse tunnused,

— mitootiline indeks,

— aberratsioonide tüüp ja arv, antud iga looma kohta eraldi,

— aberratsioonide üldarv rühma kohta ning keskväärtused ja standardhälbed,

— aberratsioone sisaldavate rakkude arv rühma kohta ning keskväärtused ja standardhälbed,

— ploidsuse muutused, kui neid esineb,

— doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral,

— võimalikud statistilised analüüsid,

— paralleelsed negatiivsed kontrollandmed,

— varasemad negatiivsed kontrollandmed ning vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed,

— paralleelsed positiivsed kontrollandmed,

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D. C., pp. 275–306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, pp. 157–165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 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. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305–312.

(5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313–319.

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184–232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403–413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362–1364."

LISA 4C

"B.12. MUTAGEENSUS — PISITUUMA KATSE IMETAJATE ERÜTROTSÜÜTIDES *IN VIVO*

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleaus Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Imetajate pisituuma katset *in vivo* kasutatakse uuritava aine põhjustatud kromosoomikahjustuse või mitoosiaparaadi kahjustuse avastamiseks erütroblastides, analüüsides loomade, tavaliselt näriliste luuüdist ja/või perifeersetest vererakkudest võetud erütrotsüüte.

Pisituuma katse eesmärk on identifitseerida ained, mis põhjustavad tsütogeenset kahjustust, mille tulemuseks on kromosoomiloive fragmente või terveid kromosoome sisaldava pisituuma moodustamine.

Kui luuüdi erütroblast areneb polükromaatseks erütrotsüüdiks, siis põhituum lükatakse välja; mis tahes moodustatud pisituum võib jääda muul viisil tuumata tsütoplasmasse. Põhituuma puudumine hõlbustab pisituumade avastamist neis rakkudes. Pisituumsete polükromaatsete erütrotsüütide sageduse suurenemine katseloomade puhul on indutseeritud kromosoomikahjustuse indikaatoriks.

Tavaliselt kasutatakse näriliste luuüdi käesolevas katses kuni polükromaatsete erütrotsüütide moodustumiseni kõnealuses koes. Ebaküpsete mikrotuumsete (polükromaatsete) erütrotsüütide mõõtmine perifeerses veres on võrdselt vastuvõetav mis tahes liigi puhul, mille põrn ei suuda hävitada pisituumseid erütrotsüüte või mis on piisavalt tundlikud selleks, et avastada struktuurseid või numbrilisi kromosoomaberratsioone põhjustavaid aineid. Pisituuma saab eristada erinevate kriteeriumide alusel. Nende hulka kuulub kinetohoori või tsentromeerse DNA olemasolu või puudumise tõendamine pisituumas. Ebaküpsete (polükromaatsete) pisituumsete erütrotsüütide esinemissagedus on peamine lõpp-punkt. Küpsete (normokromaatsete) erütrotsüütide arvu perifeerses veres, mis sisaldab pisituuma küpsete erütrotsüütide hulgas, saab samuti kasutada katse lõpp-punktina, kui loomadele manustatakse uuritavat ainet nelja või enama nädala jooksul.

Käesolev imetajate *in vivo* pisituuma katse on eriti vajalik mutageensuse ohu hindamiseks, kuna selles võidakse arvesse võtta *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA parandusprotsesside tegureid, kuigi need võivad liigiti, kudede vahel ja geneetiliste lõpp-punktide osas erineda. *In vivo* katset võidakse samuti kasutada *in vitro* katses avastatud mutageense mõju täiendaval uurimisel.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine või reaktsioonivõimeline metaboliit ei pääse sihtkoesse, ei ole sobiv kasutada käesolevat katset.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Tsentromeer (kinetohoor): kromosoomi ala(d), kus kääviniidid kinnituvad raku jagunemise ajal, võimaldades tütarkromosoomide korrapärast liikumist tütarrakkude poolustele.

Pisituum: väike tuum, mis on rakkude põhituumast eraldi ja sellega paralleelselt esinev, see on moodustunud mitoosi telofaasi (meioosi) ajal kromosoomiloive fragmentidest või tervetest kromosoomidest.

Normokromaatne erütrotsüüt: küps erütrotsüüt, millel puuduvad ribosoomid ja mida saab eristada mitteküpsetest, polükromaatsetest erütrotsüütidest ribosoomide jaoks valikuliste värvainete abil.

Polükromaatne erütrotsüüt: ebaküps erütrotsüüt, arengu vahefaasis olev erütrotsüüt, millel on endiselt alles ribosoomid ja seetõttu saab seda eristada küpsetest, normokromaatsetest erütrotsüütidest ribosoomide jaoks valikuliste värvainete abil.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Loomadele manustatakse uuritavat ainet sobiva manustamistee kaudu. Kui kasutatakse luuüdi, tapetakse loomad pärast manustamist sobival ajal, luuüdi eemaldatakse ning valmistatakse preparaadid ja need värvitakse (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Kui kasutatakse perifeerset verd, kogutakse veri sobival ajal pärast manustamist ning äigepreparaadid valmistatakse ja värvitakse (4) (8) (9) (10). Perifeerse vere uurimisel peaks jääma võimalikult vähe aega viimase manustamise ja rakkude kogumise vahele. Preparaate analüüsitakse pisituuma avastamiseks.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Preparaadid**

1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Kui kasutatakse luuüdi, siis on soovitatav kasutada hiiri või rotte, kuigi võib kasutada mis tahes imetajate liike. Perifeerse vere kasutamise korral soovitatakse hiiri. Siiski võib kasutada mis tahes imetajate liike, kelle põrn ei eemalda pisituumseid erütrotsüüte, või liike, kes on näidanud piisavat tundlikkust struktuursete või numbriliste kromosoomaberratsioonide tekitajate avastamiseks. Kasutatakse noorte tervete loomade tavaliselt kasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ±20 % iga soo keskmisest kaalust.

1.4.1.2. *Pidamis- ja söötmistingimused*

Üldise sissejuhatuse B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi otstarbekas niiskusesisaldus peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. *Loomade ettevalmistamine*

Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Loomad identifitseeritakse individuaalselt. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed.

1.4.1.4. *Annuste ettevalmistamine*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendada enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate annuste korral ja ei tohi anda keemilist reaktsiooni uuritava ainega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele võrdlusandmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist.

1.4.2.2. *Kontrollkatsed*

Käesolevasse katsesse kaasatakse mõlema sugupoole korral paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollkatsed. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neid ei töödelda uuritava ainega.

Positiivsed kontrollkatsed peaksid tekitama pisituuma *in vivo* toime tasemel, millelt oodatakse fooniga võrreldes märgatava suurenemise põhjustamist. Positiivsete kontrollainete annused valitakse sellised, et mõjud on selged, kuid neist ei ilmne riideris kohe kodeeritud objektiklaaside identsus. On aktsepteeritav, et positiivses kontrollkatses võib kasutada uuritava aine manustamisviisist erinevat viisi ja proovid võetakse üksnes korra. Lisaks võib kaalutleda samasse keemiliste ainete klassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist, kui sellised ained on kättesaadavad. Positiivsete kontrollainete näited:

Aine	CAS nr	EINECSi nr
Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
N-etüül-N-nitroso-karbamiid	759-73-9	212-072-2
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
Tsüklofosfamiid Tsüklofosfamiid monohüdraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietüleen-melamiin	51-18-3	200-083-5

Üksnes lahustit või kandjaainet saanud või muul katserühmaga sarnasel viisil töödeldud negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse proovid igal proovivõtukorral, välja arvatud siis, kui varasemad kontrollitulemused näitavad vastuvõetavat loomadevahelist varieerumist ja kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude esinemissagedust. Kui negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse üksnes üks proov, on kõige sobivam võtta see esimesel proovivõtukorral. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollproove, välja arvatud juhul, kui varasemad või avaldatud kontrollandmed näitavad, et valitud lahusti/kandjaaine ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

Kui kasutatakse perifeerset verd, võib enne töötlemist võetud proov olla samuti aktsepteeritav paralleelse negatiivse kontrollina, kuid üksnes perifeerse verega tehtud lühiajalistel katsetel (nt 1–3 töötlemist), kui saadud tulemused on varasemate kontrollide alusel oodatavas vahemikus.

1.5. MENETLUS

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Nii katse- kui kontrollrühmas on mõlemast soost vähemalt viis analüüsitavat looma (11). Kui uuringu ajal on kättesaadavad tulemused sama liigi korral sama manustamisteed kasutades tehtud uuringute kohta, mille tulemused näitavad, et toksilisuse osas ei ole olulisi erinevusi sugupoolte vahel, siis piisab katsete tegemisest vaid ühe sugupoolega. Kui inimese vastuvõtlikkus kemikaalidele on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse sobivast soost loomadega.

1.5.2. **Manustamiskava**

Ei ole võimalik soovitada ühtegi standardset manustamiskava (nt üks, kaks või enam manustamist 24-tunniste intervallidega). Pikemate manustamisrežiimide ajal kogutud proovid on aktsepteeritavad, kui positiivset mõju on näidatud käesolevas katses või negatiivses katses on näidatud toksilisust või on kasutatud piirannust ja manustamist on jätkatud proovivõtmise ajani. Uuritavaid aineid võib manustada ka jagatud annustena, näiteks kaks annust ühel päeval kuni mõnetunnise vahega, et hõlbustada suurte ainemahtude andmist.

Katset võib sooritada kahel viisil:

a) loomadele manustatakse uuritavat ainet ühel korral. Proove luuüdist võetakse vähemalt kahel korral, alustades mitte varem kui 24 tundi pärast manustamist, kuid mitte hiljem kui 48 tundi pärast manustamist ning proovide võtmise vahel on sobiv intervall. Proovide võtmine varem kui 24 tundi pärast manustamist peaks olema põhjendatud. Perifeerse vere proovid võetakse vähemalt kahel korral,

alustades mitte varem kui 36 tundi pärast manustamist ning esimesele proovile järgneb sobiv intervall, kuid mitte hiljem kui 72 tundi pärast manustamist. Kui positiivne tulemus on tuvastatav ühel proovivõtukorra järel, siis lisaproovide võtmist ei ole vaja;

b) kui kasutatakse kahte või enamat päevaannust (nt kaks või rohkem manustamist 24-tunniste intervallidega), kogutakse proovid üks kord 18–24 tundi pärast viimast manustamist luuüdisse ja korra 36–48 tundi pärast viimast manustamist perifeersesse verre (12).

Vajadusel võib lisaproove võtta muul ajal.

1.5.3. **Annused**

Kui tehakse annuse vahemiku määramiseks uuring sobivate andmete puudumisel, siis tehakse uuring samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamisrežiimi, mida kasutatakse põhiuuringus (13). Kui esineb mürgisus, kasutatakse kolme erinevat annust esimese proovivõtu jaoks. Need annused peaksid hõlmama vahemikku suurimast kuni väiksema mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni. Hilisemal proovivõtuajal on vaja kasutada üksnes suurimat annust. Suurim annus on määratletud annusena, mis põhjustab selliseid mürgistusnähte, et samale manustamisrežiimile põhinevate suuremate annuste kasutamine võib põhjustada surma. Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Suurimat annust võidakse samuti määratleda annusena, mis põhjustab mõningaid mürgisusele viitavaid muutusi luuüdis (nt ebaküpsete erütrotsüütide hulga vähenemine erütrotsüütide koguarvus luuüdis või perifeerses veres).

1.5.4. **Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehamassi kohta ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt lähedaste ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uuringut vajalikuks. Kauem kestvate uuringute korral on piirannus 2 000 mg/kg kehamassi kohta päevas kuni 14 päeva kestval manustamisel ja 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas, kui manustamine kestab kauem kui 14 päeva. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. **Manustamine**

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil või süstides kõhuõõnde. Samuti võib muid manustamisviise aktsepteerida, kui need on põhjendatud. Vedeliku suurim maht, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehamassi kohta. Suuremate mahtude kasutamine peab olema põhjendatud. Välja arvatud ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

1.5.6. **Luuüdi-/verepreparaat**

Luuüdirakud saadakse tavaliselt reieluudest või sääreluudest vahetult peale tapmist. Rakud eemaldatakse reieluudest või sääreluudest, neist tehakse preparaadid ja värvitakse kindlakskujunenud meetoditel. Perifeerne veri võetakse sabaveenist või muust sobivast veresoonest. Vererakud värvitakse kohe supravitaalvärvide abil (8) (9) (10) või tehakse äigepreparaadid ja seejärel värvitakse. DNA-spetsiifilise värvaine kasutamine (nt akridiinoranž (14) või Hoechst 33258 + püroniin-Y (15)) võib kõrvaldada mõned mitte-DNA-spetsiifiliste värvainete kasutamisega seotud artefaktid. See eelis ei välista tavaliste värvainete (nt Giemsa) kasutamist. Täiendavaid süsteeme (nt tsellulooskolonne tuumsete rakkude eemaldamiseks (16)) saab samuti kasutada, kui kõnealused süsteemid on piisavalt toimivad laboris pisituumapreparaatide valmistamiseks.

1.5.7. **Analüüs**

Ebaküpsete erütrotsüütide osa kõikide (ebaküpsete + küpsete) erütrotsüütide hulgas määratakse iga looma puhul eraldi, loendades kokku vähemalt 200 erütrotsüüti luuüdist ja 1 000 erütrotsüüti perifeersest verest (17). Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollkatsete omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Ebaküpsete pisituumsete erütrotsüütide esinemissageduse määramiseks loendatakse looma kohta vähemalt 2 000 ebaküpset erütrotsüüti. Lisateavet võidakse saada, loendades

pisituumasid küpsetes erütrotsüütides. Objektiklaase analüüsides ei tohiks ebaküpsete erütrotsüütide osa kõikide erütrotsüütide hulgas olla väiksem kui 20 % kontrollväärtusest. Kui loomadele manustatakse uuritavat ainet pidevalt nelja või enama nädala jooksul, saab loendada vähemalt 2 000 küpset erütrotsüüti looma kohta pisituumade esinemissageduse määramiseks. Automaatsed analüüsisüsteemid (kujutise analüüs ja rakususpensioonide voolutsütomeetria) on vastuvõetavad alternatiivid manuaalsele hindamisele, kui see on asjakohaselt põhjendatud ja valideeritud.

2. TULEMUSED

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabeli kujul. Katseühikuks on loom. Ebaküpsete erütrotsüütide arv, pisituumsete ebaküpsete erütrotsüütide arv ja ebaküpsete erütrotsüütide osa kõikidest erütrotsüütidest tuleks iga analüüsitava looma kohta loetleda eraldi. Kui loomadele manustatakse uuritavat ainet pidevalt nelja või enama nädala jooksul, tuleks samuti esitada teave küpsete erütrotsüütide kohta, kui seda on kogutud. Ebaküpsete erütrotsüütide osa kõikidest erütrotsüütidest ja, vajaduse korral, pisituumsete erütrotsüütide protsendimäär esitatakse iga looma kohta. Kui pole tõestust vastuse sugudevahelise erinevuse kohta, võidakse kombineerida mõlema sugupoole andmed statistiliseks analüüsiks.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse saamiseks on mitmeid kriteeriume, nt pisituumsete rakkude arvu suurenemine annusest tingituna või pisituumsete rakkude arvu selge suurenemine ühes annuse rühmas ühel proovivõtuajal. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (18) (19). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel meelepäraselt muudetud katsetingimustes.

Uuritavat ainet, mille korral saadud tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse käesolevas katses mittemutageenseks aineks.

Kuigi enamikus katsetes saadakse selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad harvadel juhtudel saadud tulemused uuritava aine aktiivsuse kohta kindlate otsuste tegemise. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

Pisituuma katse positiivsed tulemused viitavad sellele, et aine indutseerib pisituumi, mis põhjustavad kromosoomikahjustuse või mitoosiaparaadi kahjustuse katseliikide erütroblastides. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et antud katsetingimustes ei tekita aine katseliikide ebaküpsetes erütrotsüütides pisituumi.

Tõenäosust, et uuritav aine või selle metaboliidid jõuavad üldisesse vereringesse või eriti sihtkoesse (nt süsteemne toksilisus), tuleks arutada.

3. ARUANDLUS

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet:

Lahusti/kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendamine,

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui see on teada.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved,

— loomade arv, vanus ja sugu,

— päritolu, pidamistingimused, toitumine jne,

— loomade individuaalne mass katse alustamisel, sh kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

— positiivseid ja negatiivseid (lahus/kandjaaine) kontrollkatseid käsitlevad andmed,

— annuse vahemiku määramise uuringu tulemused, kui need on läbi viidud,

— annuste valimiku põhimõtted,

— uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad,

— uuritava aine manustamise üksikasjad,

— manustamistee põhjendus,

— meetodid, mis verifitseerivad, et uuritav aine jõuab üldisesse vereringesse või sihtkoesse, vajaduse korral,

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) teisendamine tegelikuks annuseks (mg/kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral,

— üksikasjad toidu- ja veekvaliteedi kohta,

— manustamis- ja proovivõtukavade üksikasjalik kirjeldus,

— objektiklaaside ettevalmistamise meetodid,

— toksilisuse mõõtmise meetodid,

— ebaküpsete pisituumsete erütrotsüütide loendamise kriteeriumid,

— analüüsitud rakkude arv looma kohta,

— kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

— toksilisuse tunnused,

— ebaküpsete erütrotsüütide osa kõikides erütrotsüütides,

— ebaküpsete pisituumsete erütrotsüütide arv, esitatakse iga looma kohta eraldi,

— ebaküpsete erütrotsüütide keskväärtus ± standardhälve rühma kohta,

— doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral,

— kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid,

— paralleelsed ja varasemad negatiivsed kontrollandmed,

— paralleelsed positiivsed kontrollandmed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187–190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9–15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61–118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29–80.

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555–558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103–112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. and Shelby, M. E. (1990), The in vivo Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513–522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245–249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridime Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83–98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 53–159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), in Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293–304.

(12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313–319.

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313–319.

(14) Hayashi, M., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241–247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269–275.

(16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91–104.

(17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97–99.

(18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part 1, revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115–141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Staticical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184–232."

LISA 4D

"B.13/14. MUTAGEENSUS — BAKTERITE PÖÖRDMUTATSIOONKATSE

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Bakterite pöördmutatsioonkatse kasutab aminohappeid vajavaid *Salmonella typhimurium'*i ja *Escherichia coli* tüvesid punktmutatsiooni avastamiseks, millega kaasneb ühe või mitme DNA aluspaari asendus, lisamine või deletsioon (1) (2) (3). Käesoleva bakterite pöördmutatsioonkatse põhimõtteks on avastada mutatsioonid, mis parandavad katsetüvedes olevaid mutatsioone ja taastavad bakterite funktsionaalse võime sünteesida põhilisi aminohappeid. Revertantsed bakterid avastatakse seepärast, et nad on võimelised kasvama, kuigi katsebakteritüves vajalik aminohape puudub.

Punktmutatsioonid põhjustavad inimestel mitmeid geneetilisi haigusi ja on märkimisväärseid tõendeid selle kohta, et punktmutatsioonid onkogeenides ja keharakkude kasvaja supressorgeenides osalevad inimeste ja katseloomade kasvajate moodustumisel. Bakterite pöördmutatsioonkatse on kiire, odav ja suhteliselt kergesti sooritatav. Paljudel katsetüvedel on mitmeid omadusi, mis muudavad nad tundlikumaks mutatsioonide avastamiseks, sh kergesti reageerivad DNA järjestused pöördmutatsiooni saitides, rakkude suurenenud läbitavus suurte molekulide suhtes ja DNA parandamise süsteemide kõrvaldamine või vigadele vastuvõtlike DNA parandamisprotsesside tõhustamine. Katsetüvede spetsiifilisus võib anda vajalikku teavet genotoksiliste ainete põhjustatud mutatsiooni tüüpide kohta. Väga ulatuslik andmebaas eri struktuuride korral saadud tulemuste kohta on kättesaadav bakterite pöördmutatsioonkatsete põhjal ja kindlakskujunenud meetodid on välja töötatud erinevate füüsikalis-keemiliste omadustega keemiliste ainete, sh lenduvate ühendite testimiseks.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Pöördmutatsioonkatse kas *Salmonella typhimurium'*i või *Escherichia coli* puhul avastab mutatsiooni aminohapet (vastavalt histidiinis või trüptofaanis) nõudvas tüves, mille tulemusena tekib väljastpoolt saadud aminohappest sõltumatu tüvi.

Aluspaari asendusmutageenid on ained, mis põhjustavad aluse vahetust DNAs. Pöördmutatsioonkatses võib kõnealune muutus aset leida algupärase mutatsiooni kohas või muus bakterigenoomi saidis.

Raaminihke mutageenid on ained, mis põhjustavad ühe või mitme DNA aluspaari lisamist või deletsiooni, seega muutes RNA lugemisraami.

1.3. ALGSED KAALUTLUSED

Bakterite pöördmutatsioonkatse kasutab prokarüootseid rakke, mis erinevad imetajate rakkudest sellise tegurite poolest nagu tagasihaare, metabolism, kromosoomi struktuur ja DNA parandamisprotsessid. Läbiviidud *in vitro* katsed üldjuhul nõuavad eksogeenset metaboolset aktiveerimist. *In vitro* metaboolse aktiveerimise süsteem ei saa tervenisti jäljendada *in vivo* tingimusi imetajatel. Seetõttu ei anna katse otsest teavet aine mutageensuse või kantserogeensuse kohta imetajatel.

Bakterite pöördmutatsioonkatset kasutatakse tavaliselt genotoksilisust ja eriti punktmutatsiooni põhjustava tegevuse algseks skriinimiseks. Ulatuslik andmebaas on näidanud, et mitmed keemilised ained, mis annavad käesolevas katses positiivseid tulemusi, omavad mutageenset aktiivsust ka muudes katsetes. On näiteid mutageensetest ainetest, mida ei avastata käesoleva katse abil; nende ebaõnnestumiste põhjusteks

on avastatud lõpp-punkti spetsiifiline olemus, metaboolse aktiveerimise erinevused või biosaadavuse erinevused. Teisalt võivad tegurid, mis tõhustavad bakterite pöördmutatsioonikatse tundlikkust, viia mutageense aktiivsuse ülehindamiseni.

Bakterite pöördmutatsioonkatse ei sobi teatud klassidesse kuuluvate keemiliste ainete hindamiseks, nt väga bakteritsiidsed ühendid (nt teatud antibiootikumid) ja need, mida peetakse (või tuntakse) imetajate raku replikatsioonisüsteemi (nt mõnede topoisomeraasi inhibiitorite ja mõnede nukleosiidide analoogide) mõjutajatena. Sellistel juhtudel on imetajate mutatsioonikatsed sobivamad.

Kuigi paljud ühendid, mis annavad positiivseid tulemusi käesolevas katses, on imetajate kantserogeenid, ei ole korrelatsioon täielik. See sõltub keemilisest aineklassist ning esineb kantserogeene, mida käesoleva katse abil ei avastata, kuna nad tegutsevad muude, mitte-genotoksiliste mehhanismide või bakterirakkudes puuduvate mehhanismide abil.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Bakterirakkude suspensioonid allutatakse uuritava aine toimele eksogeense metaboolse aktiveerimise olemasolu ja puudumise korral. Vahetu kokkusegamise meetodil segatakse kõnealused suspensioonid külviagariga ja asetatakse vahetult minimaalsesse kasvukeskkonda. Preinkubatsioonimeetodi puhul inkubeeritakse uuritavat ainet sisaldav segu ja segatakse seejärel külviagariga enne minimaalsesse kasvukeskkonda asetamist. Mõlema metoodika puhul pärast kahte või kolme inkubatsioonipäeva loendatakse revertantkolooniad ja võrreldakse nende arvu spontaansete revertantkolooniate arvuga lahusti kontrollplaatidel.

On kirjeldatud mitmeid bakterite pöördmutatsioonkatse sooritamise menetlusi. Nende seas on enimkasutatavad vahetu kokkusegamise meetod (1) (2) (3) (4), preinkubatsioonimeetod (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuatsioonimeetod (9) (10) ja suspensioonimeetod (11). Gaaside või aurude uurimist käsitlevaid muudatusi on kirjeldatud (12).

Kõnealuses meetodis kirjeldatud menetlused puudutavad peamiselt vahetu kokkusegamise ja preinkubatsioonimeetodit. Nende mõlema abil võidakse teha katseid koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta. Mõned ained võivad olla paremini tuvastatavad preinkubatsioonimeetodi abil. Need ained kuuluvad keemilistesse aineklassidesse, kus on lühiahelalised alifaatsed nitrosoamiinid, metallid oksüdatsiooniastmega +2, aldehüüdid, asovärvid ja diasoühendid, pürollisidiinalkaloidid, allüülühendid ja nitroühendid (3). Samuti on täheldatud, et teatud mutageenide klasse ei tuvastata alati standardmenetluste abil, nagu nt vahetu kokkusegamise meetodil või preinkubatsioonimeetodil. Neid tuleks vaadelda "erijuhtudena" ja on rangelt soovitatav, et nende tuvastamiseks kasutataks alternatiivseid menetlusi. Järgmised "erijuhud" on võimalik ära tunda (koos menetluste näidetega, mida võib nende tuvastamiseks kasutada): asovärvained ja diasoühendid (3) (5) (6) (13), gaasid ja lenduvad kemikaalid (12) (14) (15) (16) ning glükosiidid (17) (18). Kõrvalekaldeid standardmenetlustest on vaja teaduslikult põhjendada.

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Preparaadid**

1.5.1.1. *Bakterid*

Värsked bakterikultuurid tuleb kasvatada kuni hilise eksponentsiaalse või varase statsionaarse kasvufaasini (ligikaudu 10^9 rakku ml kohta). Hilises statsionaarses faasis olevaid kultuure ei tohiks kasutada. On oluline, et katses kasutatavad kultuurid sisaldaksid elujõuliste rakkude suuri tiitreid. Tiitrit võib näidata, kas varasematest kontrollkatsetest saadud kasvukõverate abil või määrates igas analüüsis elujõuliste rakkude arv külvikatsel.

Soovitav inkubatsioonitemperatuur on 37 °C.

Tuleks kasutada vähemalt viit bakteritüve. Nende hulka peaks kuuluma neli tüve *S. typhimurium*'ilt (TA 1535; TA 1537 või TA97a või TA97; TA98; ja TA100), mida peetakse usaldusväärseteks ja mis on andnud reprodutseeritava vaste eri laborites. Nendes neljas *S. typhimurium*' i tüves on GC aluspaarid algses pöördmutatsioonisaidis ja on teada, et need ei avasta teatud oksüdeerivaid mutageene, ristseoseid moodustavaid aineid ja hüdrasiine. Selliseid aineid võib avastada *E. coli* WP2-tüvede või *S. typhimurium* TA102 (19) abil, millel on AT aluspaar algses pöördmutatsioonisaidis. Seetõttu on soovitavad tüvede kombinatsioonid:

— *S. typhimurium* TA1535,

— *S. typhimurium* TA1537 või TA97 või TA97a,

— *S. typhimurium* TA98,

— *S. typhimurium* TA100,

— *E. coli* WP2 uvrA või *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) või *S. typhimurium* TA102.

Ristseostuvate mutageenide avastamiseks on eelistatav kasutada TA102 või lisada DNA parandusele spetsiifilist *E. coli* tüve (nt *E. coli* WP2 või *E. coli* WP2 (pKM101)).

Tüvikultuuri preparaatide valmistamiseks, markeri verifitseerimiseks ja säilitamiseks tuleks kasutada väljakujunenud menetlusi. Kasvuks mõeldud aminohappe vajadust tuleks näidata iga külmutatud tüvikultuuri varupreparaadi puhul (*S. typhimurium* tüvede puhul histidiin ja *E. coli* tüvede puhul trüptofaan). Muid fenotüüpseid tunnuseid tuleks vastavalt kontrollida: R-faktori plasmiidide esinemist või puudumist, vajaduse korral (nt ampitsilliini resistentsus TA98, TA100 ja TA97a või TA97, WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) tüvede puhul ning ampitsilliini + tetratsükliini resistentsus TA102 tüve puhul); iseloomulike mutatsioonide esinemine (nt tundlikkusest kristallvioleti suhtes põhjustatud rfa-mutatsioon *S. typhimurium*'is ja tundlikkusest ultraviolettkiirguse suhtes põhjustatud uvrA-mutatsioon *E. coli*' s või uvrB-mutatsioon *S. typhimurium*'is) (2) (3). Tüved peaksid samuti andma plaatidel spontaansete revertantsete bakterite kolooniate loendamise tulemusi, mis vastavad laborite esinemissageduste kontrollandmete vahemikele ja kirjanduses eelistatult esitatud vahemikele.

1.5.1.2. *Sööde*

Kasutatakse sobivat minimaalset agarit (sisaldab nt Vogel-Bonneri minimaalset söödet E ja glükoosi) ja külviagarit, mis sisaldab histidiini ja biotiini või trüptofaani, mis võimaldavad raku jagunemist (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metaboolne aktiveerimine*

Bakterid puutuvad kokku uuritava ainega nii vastava metaboolse aktiveerimissüsteemi olemasolu kui ka puudumise korral. Enimkasutatav süsteem on ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254-ga (1) (2) või fenobarbitooni ja β-naftoflavooni seguga (18) (20) (21) töödeldud näriliste maksast valmistatud postmitokondriaalne osa (S9), millele on lisatud kofaktor. Tavaliselt kasutatakse postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsiooni vahemikus 5–30 mahuprotsenti S9-segus. Metaboolse aktiveerimissüsteemi valik ja tingimused võivad sõltuda uuritava keemilise aine klassist. Mõnel juhul on vaja kasutada postmitokondriaalse fraktsiooni rohkem kui üht kontsentratsiooni. Asovärvainete ja diasoühendite puhul võib olla sobivam kasutada redutseerivat metaboolse aktiveerimise süsteemi (6) (13).

1.5.1.4. *Uuritav aine/preparaat*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne bakterite töötlemist. Vedelad uuritavad ained võib lisada vahetult katsesüsteemidesse ja/või lahjendada enne manustamist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Lahusti/kandjaaine ei tohiks uuritava ainega astuda keemilisse reaktsiooni ning see peaks sobima rakkude eluvõimelisuse ja S9 aktiivsusega (22). Kui kasutatakse muud kui tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, siis peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahustite/-kandjaaine kasutamist. Vees ebapüsivate ainete uurimisel kasutatavad orgaanilised lahustid peavad olema veevabad.

1.5.2. **Katsetingimused**

1.5.2.1. *Katsetüved* (vt 1.5.1.1)

1.5.2.2. *Manustamise kontsentratsioon*

Kasutatavate katseainete suurima koguse määramisel võetakse arvesse tsütotoksilisust ja lahustuvust lõplikus katsesegus.

Tsütotoksilisust ja lahustuvust võib olla kasulik määrata eelkatses. Tsütotoksilisust võib tuvastada töödeldud kultuurides revertantsete kolooniate arvu vähenemise, lausfooni selginemise või vähenemise või rakkude ellujäämisastme abil. Aine tsütotoksilisust võib muuta metaboolsete aktiveerimissüsteemide esinemise korral. Lahustumatust tuleks hinnata lõplikus segus palja silmaga nähtava sadestuse tekke põhjal tegelikes katsetingimustes.

Soovitatav suurim katsekontsentratsioon lahustuvate mittetoksiliste ainete kohta on 5 mg plaat või 5 µl plaat. Mittetoksiliste ainete puhul, mis on lahustumatud kontsentratsioonidel 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta, peaks üks või enam uuritavat kontsentratsiooni vastama lahustumatusele lõplikus katsesegus. Katseaineid, mis on tsütotoksilised juba kontsentratsioonidel alla 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta, tuleks testida tsütotoksilise kontsentratsiooni suhtes. Sadestus ei tohiks mõjutada tulemust.

Tuleks kasutada vähemalt viit erinevat analüüsitava katseaine kontsentratsiooni, mille korral on katsepunktidele vastav vahemik ligikaudu poollogaritmiline (nt Ö10). Kontsentratsioonsõltuvuse uurimisel võivad olla sobivamad väiksemad intervallid. Hinnates aineid, mis sisaldavad märkimisväärsel hulgal võimalikke mutageenseid lisandeid, võib kõne alla tulla katsete tegemine suuremate kontsentratsioonidega kui 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta.

1.5.2.3. *Negatiivsed ja positiivsed kontrollkatsed*

Igas katses kasutatakse paralleelseid positiivseid ja negatiivseid (lahusti või kandjaaine) kontrollkatseid nii metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta. Positiivsetes kontrollkatsetes kasutatavad kontsentratsioonid tuleb valida selliselt, et need näitaksid iga katse sooritamise tõhusust.

Metaboolset aktiveerimissüsteemi kasutavate katsete puhul tuleks välja valida positiivsete kontrollkatsete võrdlusaine(d) kasutatavate bakteritüvede tüübi põhjal.

Järgmised ained on näited sobivatest positiivsetest kontrollainetest metaboolse aktiveerimisega katsete jaoks:

Aine	CAS nr	EINECSi nr
9,10-dimetüül-antratseen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetüülbens(a) antratseen	57-97-6	200-359-5
Benso(a)püreen	50-32-8	200-028-5
2-amino-antratseen	613-13-8	210-330-9
Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
Tsüklofosfamiid monohüdraat	6055-19-2	

Järgmine aine on sobiv positiivseks kontrolliks redutseeriva metaboolse aktiveerimise meetodi jaoks:

Aine	CAS nr	EINECSi nr
Kongo punane	573-58-0	209-358-4

2-aminoantratseeni ei tohiks kasutada S9-segu tõhususe ainsa indikaatorina. Kui kasutatakse 2-aminoantratseeni, peaks iga S9-partiid samuti iseloomustama mutageeniga (nt benso[*a*]püreen, dimetüülbensantratseen), mis eeldab mikrosomaalse ensüümi tekitatud metaboolset aktiveerimist.

Järgmised ained on näited positiivsetest tüvele spetsiifilistest sobivatest kontrollainetest eksogeense metaboolse aktiveerimissüsteemiga katsete jaoks:

Aine	CAS nr	EINECSi nr	Tüvi
Naatriumasiid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 ja TA 100
2-nitro-fluoreen	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-amino-akridiin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
Kumeenvesinikperoksiid	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA ja TA 102
1-metüül-3-nitro-1-nitrosoguanidiin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA (pKM101)
4-nitro-kinoliin-*N* — oksiid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA (pKM101)
Furiil-furamiid (AF2)	3688-53-7		Plasmiidi sisaldavad tüved

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivse kontrolli võrdlusaineid. Lähedasse keemilisse aineteklassi kuuluvate positiivsete keemiliste kontrollainete kasutamist tuleks kaaluda, kui selline aine on kättesaadav.

Tuleks kasutada negatiivseid kontrollaineid, mis sisaldavad üksnes lahustit või kandjaainet ilma katseaineta ja mida muidu manustatakse sarnasel viisil nagu katserühmade puhul. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollkatseid, välja arvatud juhul, kui varasemad andmed kontrollaine kohta näitavad, et valitud lahusti ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.5.3. **Menetlus**

Vahetu kokkusegamise meetodil (1) (2) (3) (4), ilma metaboolse aktiveerimiseta, segatakse 2,0 ml külviagariga tavaliselt 0,05 ml või 0,1 ml katselahuseid, 0,1 ml värskeid bakterikultuure (mis sisaldavad ligikaudu 10^8 elujõulist rakku) ja 0,5 ml steriilset puhvrit. Metaboolse aktiveerimisega katse puhul segatakse tavaliselt 0,5 ml metaboolse aktiveerimise segu, mis sisaldab piisaval hulgal postmitokondriaalset fraktsiooni (vahemikus 5–30 mahuprotsenti metaboolse aktiveerimise segus) külviagari (2,0 ml) ja bakterite ja uuritava aine/katselahusega. Iga katseklaasi sisu segatakse ja külvatakse minimaalse agarinõu pinnale. Külviagarit võib lasta tahkestuda enne inkubatsiooni.

Eelinkubatsioonimeetodi puhul (2) (3) (5) (6) eelinkubeeritakse uuritav aine/katselahus uuritava tüvega (mis sisaldab ligikaudu 10^8 elujõulist rakku) ja steriilse puhvriga või metaboolse aktiveerimise süsteemiga (0,5 ml) enamasti 20 minutit või kauem 30–37 °C juures enne külviagariga segamist ja külvatakse minimaalse agariplaadi pinnale. Tavaliselt segatakse 0,05 või 0,1 ml uuritavat ainet/katselahust, 0,1 ml baktereid ja 0,5 ml S9-segu või steriilset puhvrit 2,0 ml külviagariga. Katseklaase tuleks täita õhuga eelinkubatsiooni ajal, kasutades selleks loksutit.

Varieerumise piisavaks hindamiseks tuleks kasutada kolme paralleelset plaati iga annuse korral. Kahe paralleelse plaadi kasutamine on aktsepteeritav siis, kui seda on teaduslikult põhjendatud. Plaadi juhuslikul kaotsiminekul ei tunnistata katset ilmtingimata kehtetuks.

Gaasilisi või lenduvaid aineid uuritakse sobiva meetodi abil, näiteks suletud kasvuanumates (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubatsioon**

Kõiki antud katse anumaid tuleks inkubeerida 37 °C juures 48–72 tundi. Pärast inkubatsiooniperioodi loendatakse kokku revertantsete kolooniate arv plaadi kohta.

2. **TULEMUSED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tulemused tuleks esitada revertantsete kolooniate arvuna plaadi kohta. Revertantsete kolooniate arv nii negatiivsete (lahusti kontrollkatse ja töötlemata kontrollkatse, kui seda kasutatakse) kui ka positiivsete kontrollplaatide korral tuleks esitada. Üksikute plaatide korral loendatud bakterite arvud, revertantsete kolooniate keskmine arv plaadi kohta ja standardhälve tuleks esitada uuritava aine ning positiivsete ja negatiivsete (töötlemata ja/või lahusti) kontrollkatsete kohta.

Selget positiivset vastust ei ole vaja verifitseerida. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel meelepäraselt muudetud katsetingimustes. Negatiivseid tulemusi kinnitatakse igal üksikjuhul eraldi. Neil juhtudel, kui negatiivsete tulemuste kinnitamist ei peeta vajalikuks, esitatakse põhjendus. Katse parameetrite muutmist hinnatud tingimuste vahemiku suurendamiseks tuleks arvesse võtta järelkatsetel. Katse parameetrid, mida võidakse muuta, hõlmavad kontsentratsioonivahemikku, manustamisviisi (vahetu kokkusegamise või vedeliku eelinkubatsiooni meetod) ja metaboolse aktiveerimise tingimusi.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse määramise kriteeriumid, nagu näiteks kontsentratsiooniga seotud uuritava vahemiku suurenemine ja/või ühes või mitmes kontsentratsioonis revertantsete kolooniate arvu reprodutseeruv suurenemine plaadil vähemalt ühe tüvekorral süsteemis koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta (23). Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (24). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse saamiseks.

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas katses.

Kuigi enamikel katsetel on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud korduskatsete arvust sõltumata.

Bakterite pöördmutatsioonkatse positiivsed tulemused näitavad, et aine põhjustab punktmutatsioone aluste asendamise või *Salmonella typhimurium*'i ja/või *Escherichia coli* genoomi raaminihke abil. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et uuritav aine ei ole katsetingimustes mutageenne uuritavate liikide puhul.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab hõlmama järgmist teavet:

Lahusti/kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendus,

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Tüved:

— kasutatavad tüved,

— rakkude arv rakukultuuri kohta,

— tüvede omadused.

Katsetingimused:

— uuritava aine hulk plaadi kohta (mg plaadi kohta või µl plaadi kohta) annuse valiku põhjendusega ja plaatide arvuga ühe kontsentratsiooni kohta,

— kasutatavad söötmed,

— metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle vastuvõetavuse kriteeriumid,

— manustamismenetlused.

Tulemused:

— toksilisuse tunnused,

— sadestuse tunnused,

— individuaalsed loendusandmed plaadi kohta,

— revertantsete kolooniate keskmine arv plaadi kohta ja standardhälve,

— doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral,

— võimalikud statistilised analüüsid,

— paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed,

— varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347–364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173–215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217–233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program,*Mutation Res.*, 168, pp. 69–240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, pp. 91–96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273–285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13–61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167–177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.*, 38, pp. 33–42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141–161.

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, Environmental Mutagenesis, 3, pp. 453–465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335–344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33–47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2–141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249–258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421–441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780–3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961–4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285–291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85–88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175–177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343–350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83–91.

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28–65."

LISA 4E

"B.17. MUTAGEENSUS — *IN VITRO* IMETAJATE RAKKUDE GEENIMUTATSIOONKATSE

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

In vitro imetajate rakkude geenimutatsioonkatset saab kasutada keemiliste ainete põhjustatud geenimutatsioonide avastamiseks. Sobivate rakuliinide hulka kuuluvad hiire lümfoomirakud L5178Y, hiina hamstri rakuliinid CHO, CHO-AS52 ja V79 ning inimeste lümfoblastoidrakud TK6 (1). Kõnealustes rakuliinides enimkasutatavad geneetilised lõpp-punktid mõõdavad mutatsioone tümidiinkinaasi- (TK) ja hüpoksantiin-guaniinfosforibosüültransferaasil (HPRT) ja ksantiin-guaniinfosforibosüültransferaasil (XPRT). TK-, HPRT- ja XPRT-mutatsiooni katsed avastavad erinevaid geneetilisi juhtumeid. TK ja XPRT autosomaalne asukoht võimaldab avastada geneetilisi juhtumeid (nt suuri deletsioone), mida ei avastata X-kromosoomides HPRT-lookuses (2) (3) (4) (5) (6).

In vitro imetajate rakkude geenimutatsioonkatses saab kasutada kindlakskujunenud rakuliinide või rakutüvede kultuure. Kasutatavad rakud valitakse kultuuris kasvamisvõime ja nende spontaanse mutatsioonisageduse stabiilsuse põhjal.

Läbiviidud *in vitro* katsed üldjuhul nõuavad eksogeenset metaboolset aktiveerimist. Kõnealune metaboolse aktiveerimise süsteem ei saa tervenisti jäljendada *in vivo* tingimusi imetajates. Tuleks hoolikalt vältida tingimusi, mille tulemused ei peegelda neile omaseid mutageensusi. Positiivsed tulemused, mis ei peegelda omast mutageensust, võivad tekkida pH, osmolaalsuse või tsütotoksilisuse kõrgete tasemete muutuste põhjal (7).

Kõnealust katset kasutatakse imetajate võimalike mutageenide ja kantserogeenide skriinimiseks. Mitmed ühendid, mis annavad positiivseid tulemusi kõnealuses katses, on imetajate kantserogeenid; siiski ei ole kõnealuse katse ja kantserogeensuse vahel täielikku korrelatsiooni. Korrelatsioon sõltub keemilisest aineklassist ning üha suuremal arvul esineb kantserogeene, mida ei avastata käesoleva katse abil, kuna need toimivad muude, mitte-genotoksiliste mehhanismide või bakterirakkudes puuduvate mehhanismide abil (6).

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Päripidine mutatsioon: geenimutatsioon parentaalset tüüpi mutantvormist, mille tulemusena kodeeritud valk kaotab ensümaatilise aktiivsuse või seda ensümaatilist aktiivsust muudetakse.

Aluspaari asendust põhjustavad mutageenid: ained, mis põhjustavad ühe või mitme aluspaari asendust DNAs.

Raaminihke mutageenid: ained, mis põhjustavad ühe või mitme aluspaari lisamist või deletsiooni DNA-molekulis.

Fenotüübi ekspressiooniaeg: periood, mille jooksul muutmata geeniproduktid lahkuvad äsja muteerunud rakkudest.

Mutatsioonsagedus: vaadeldud mutantrakkude arv, mis on jagatud elujõuliste rakkude arvuga.

Suhteline kogukasv: rakkude arvu suurenemine ajas võrrelduna rakkude kontrollpopulatsiooniga; arvutatud korrutisena, mille teguriteks on suspensioonikasv negatiivse kontrollkatse suhtes ja kloonimisefektiivsus negatiivse kontrollkatse suhtes.

Suhteline suspensioonikasv: rakkude arvu suurenemine ekspressiooniperioodi jooksul võrreldes negatiivse kontrollkatsega.

Elujõulisus: töödeldud rakkude kloonimisefektiivsus valiktingimustel plaatidele paigutamisel pärast ekspressiooniperioodi.

Ellujäämine: töödeldud rakkude kloonimisefektiivsus plaatidele paigutamisel töötlemisperioodi lõpus; ellujäämist väljendatakse tavaliselt rakkude kontrollpopulatsiooni elujäämise suhtes.

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Rakud, millel $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ -mutatsiooni tulemusel puudub tümidiinkinaas (TK), on resistentsed pürimidiini analoogi trifluorotümidiini (TFT) tsütotoksiliste mõjude suhtes. Tümidiinkinaasi suhtes spetsiifilised rakud on tundlikud TFT-le, mis takistab rakuainevahetust ja peatab edasise raku jagunemise. Seega mutantrakud on võimelised TFT esinemise korral vohama, samas kui normaalsed rakud, milles on tümidiinkinaas, ei voha. Analoogiliselt valitakse HPRT- või XPRT-defitsiidiga rakud 6-tioguaniinile (TG) või 8-asaguaniinile (AG) resistentsuse alusel. Uuritava aine omadusi tuleb hoolikalt arvesse võtta, kui testitakse selektiivainega seotud alusanaloogi või ühendit mis tahes imetajate rakkude geenimutatsiooni katsetes. Näiteks tuleb uurida uuritava aine võimalikku kahtlustatavat selektiivset toksilisust mutantsetes või mittemutantsetes rakkudes. Valikusüsteemi/aine efektiivsust tuleb kinnitada, testides selektiivainega lähedase struktuuriga kemikaale (8).

Suspensioonis või monokihilises kultuuris olevad rakud allutatakse uuritava aine toimele, nii koos metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta, sobiva aja jooksul ning tsütotoksilisuse määramiseks külvatakse rakud ümber võimaldamaks fenotüübi avaldumist enne mutandi valikut (9) (10) (11) (12) (13). Tavaliselt määratakse tsütotoksilisus suhtelise kloonimisefektiivsuse (ellujäämise) või suhtelise rakkude kogukasvu mõõtmisega pärast töötlemisperioodi. Töödeldud katsekultuure hoitakse kasvukeskkonnas piisava aja jooksul, mis on igale valitud lookusele ja rakutüübile iseloomulik, võimaldamaks saavutatud mutatsioonide fenotüüpide avaldumist võimalikult lähedal optimaalsele tasemele. Mutatsioonisagedus määratakse teadaoleva arvu rakkude külvamisel söötmesse, mis sisaldab selektiivainet, millega avastatakse mutantrakud, ja söötmesse, milles pole selektiivainet kloonimisefektiivsuse (elujõulisuse) määramiseks. Pärast piisavat inkubatsiooniaega loendatakse kolooniad. Mutatsioonisagedus saadakse selektiivses kasvukeskkonnas olevate mutantkolooniate arvu ja mitteselektiivses keskkonnas olevate kolooniate arvu alusel.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Preparaadid**

1.4.1.1. *Rakud*

Käesolevas katses kasutatakse erinevaid rakutüüpe, sh L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 või TK6 rakkude subkloone. Käesolevas katses kasutatavad rakutüübid on näidanud tundlikkust keemiliste mutageenide suhtes, suurt kloonimisefektiivsust ja stabiilset spontaanset mutatsioonsagedust. Rakkudes kontrollitakse mükoplasma saastatust ja saastumise korral ei tohiks neid kasutada.

Katsed tuleb kavandada etteantud tundlikkusest ja usaldusväärsusest lähtudes. Rakkude, kultuuride ja uuritava aine kontsentratsioonide arv peaks peegeldama neid määratletud parameetreid (14). Töötlemise järel ellujäänud ja igas katsefaasis kasutatavate elujõuliste rakkude minimaalne arv peaks põhinema spontaansel mutatsioonsagedusel. Üldjuhendiks on see, et rakkude arv on vähemalt 10-kordse spontaanse mutatsioonsageduse pöördväärtus. On soovitatav kasutada vähemalt 10^6 rakku. Kasutatava rakusüsteemi kohta peab olema piisavalt varasemaid andmeid, mis viitavad katse efektiivsuse vastavusele.

1.4.1.2. *Kasvukeskkonnad ja söötmed*

Tuleks kasutada sobivaid kasvukeskkondasid ja inkubatsioonitingimusi (kasvuanumad, temperatuur, CO_2 kontsentratsioon ja niiskus). Kasvukeskkonnad tuleks valida vastavalt katses kasutavatele valikusüsteemidele ja rakutüüpidele. On eriti tähtis, et kasvutingimused valitakse nii, et tagada rakkude optimaalne kasv ekspressiooniperioodi ajal, ja nii mutantsete kui mittemutantsete rakkude võimele moodustada kolooniaid.

1.4.1.3. *Rakukultuuride ettevalmistamine*

Rakud paljundatakse tüvekultuuridest, mis on külvatud kasvukeskkonda ja inkubeeritud 37 °C juures. Enne käesoleva katse tegemist tuleb kultuurid puhastada varasematest mutantrakkudest.

1.4.1.4. *Metaboolne aktiveerimine*

Rakud allutatakse uuritava aine toimele nii vastava metaboolse aktiveerimissüsteemi olemasolu kui ka puudumise korral. Enimkasutatav süsteem on ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254-ga (15) (16) (17) (18) või fenobarbitooni ja β-naftoflavooni seguga (19) (20) töödeldud näriliste maksast valmistatud postmitokondriaalne osa (S9), millele on lisatud kofaktor.

Tavaliselt kasutatakse postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsioonis 1–10 mahuprotsenti lõplikus katsekeskkonnas. Metaboolse aktiveerimissüsteemi valik ja tingimused võivad sõltuda uuritava keemilisest aineklassist. Mõnel juhul on vaja kasutada rohkem kui üht postmitokondriaalse fraktsiooni kontsentratsiooni.

Osade meetodite korral, sh geneetiliselt muudetud rakuliini saamine, mis ekspresseerib spetsiifilisi aktiveerimisensüüme, võib avalduda endogeense aktiveerimise võime. Kasutatavate rakuliinide valik peab olema teaduslikult põhjendatud (nt tsütokroom P450 isoensüümi tähtsus uuritava aine metabolismile).

1.4.1.5. *Uuritav aine ettevalmistamine*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne rakkude töötlemist. Vedelad uuritavad ained võib lisada vahetult katsesüsteemidesse ja/või lahjendada enne töötlemist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohiks astuda uuritava ainega keemilisse reaktsiooni ning see peaks sobima rakkude eluvõimelisuse ja S9 aktiivsusega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, siis peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist. Vees ebapüsivate ainete uurimisel kasutatavad orgaanilised lahustid peavad olema veevabad. Vett saab eemaldada molekulaarsõelte lisamisega.

1.4.2.2. *Toimimiseks kasutatavad kontsentratsioonid*

Suurima kontsentratsiooni määramisel on arvestatavad kriteeriumid tsütotoksilisus, lahustuvus katsesüsteemis ning pH või osmolaalsuse muutused.

Tsütotoksilisus määratakse põhikatses kindlaks nii metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta, kasutades sobivaid rakkude puhtuse ja kasvu indikaatoreid, nt suhtelist kloonimisefektiivsust (ellujäämine) või suhtelist kogukasvu. Tsütotoksilisust ja lahustuvust võib olla kasulik määrata eelkatses.

Tuleks kasutada vähemalt nelja analüüsitavat kontsentratsiooni. Kui esineb tsütotoksilisust, peaksid need kontsentratsioonid katma vahemiku suurimast kontsentratsioonist vähimani või sellise kontsentratsioonini, mille korral mürgisus puudub; mis tavaliselt tähendab seda, et kontsentratsioonide erinevus üksteisest võib olla mitte rohkem kui vahemikus 2 kuni $\sqrt{10}$ asuv koefitsient korda. Kui maksimaalne kontsentratsioon põhineb tsütotoksilisusel, siis on selle tulemuseks ligikaudu 10–20 % (aga mitte vähem kui 10 %) suhteline ellujäämine (suhteline kloonimisefektiivsus) või suhteline kogukasv. Suhteliselt mittetsütotoksiliste ainete puhul peaks suurim katsekontsentratsioon olema 5 µl/ml, 5 mg/ml or 1,01 M, selle järgi, olenevalt sellest, milline neist on väikseim.

Suhteliselt lahustumatute ainetega tehakse katseid kasvukeskkonnatingimustes kuni lahustuvuspiirini või üle selle. Lahustumatus määratakse lõplikus katsekeskkonnas, kuhu on rakud paigutatud. On kasulik hinnata lahustuvust töötlemise alguses ja lõpus, kuna katsesüsteemis võib lahustuvus töötlemise ajal muutuda rakkude, S9-seerumi jms mõjul. Lahustumatust saab avastada palja silmaga. Sadestus ei tohiks mõjutada tulemust.

1.4.2.3. *Kontrollkatsed*

Igas uuringus kasutatakse paralleelseid positiivseid ja negatiivseid (lahusti või kandjaaine) kontrollkatseid nii koos metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta. Kui kasutatakse metaboolset aktiveerimist, käsitletakse positiivse kontrollainena sellist kemikaali, mis eeldab aktiveerimist mutageense reaktsiooni saamiseks.

Positiivsete kontrollainete näited:

Metaboolse aktiveerimise tingimus	Lookus	Aine	CAS nr	EINECSi nr
Eksogeense metaboolse aktiveerimise puudumine	HPRT	Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		N-etüül-N-nitroso-karbamiid	759-73-9	212-072-2
	TK (väikesed ja suured kolooniad)	Metüül-metaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		N-etüül-N-nitroso-karbamiid	759-73-9	212-072-2
Eksogeense metaboolse aktiveerimise olemasolu	HPRT	3-metüül-kolantreen	56-49-5	200-276-4
		Dimetüülnitrosoamiin	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetüülbens(a) antratseen	57-97-6	200-359-5
	TK (väikesed ja suured kolooniad)	Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
		Tsüklofosfamiid monohüdraat	6055-19-2	
		Benso(a)püreen	50-32-8	200-028-5
		3-metüül-kolantreen	56-49-5	200-276-5
	XPRT	Dimetüülnitrosoamiin (S9 kõrge taseme jaoks)	62-75-9	200-549-8
		Benso(a)püreen	50-32-8	200-028-5

Muid sobivaid positiivse kontrolli võrdlusaineid võib kasutada nt siis, kui laboril on andmebaas 5-bromo-2'-desoksüuridiini kohta (CASi nr 59-14-3, EINECSi nr 200-415-9), siis võib samuti kasutada kõnealust võrdlusainet. Lähedasse keemilisse aineklassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist tuleks kaaluda, kui selline aine on kättesaadav.

Negatiivsed kontrollid, mis koosnevad üksnes kasvukeskkonnas olevast lahustist või kandjaainest ning mida on käsitletud samal viisil kui katserühma, peaksid sisalduma. Lisaks sellele käsitletakse ka manustamata kontrollaineid, välja arvatud juhul, kui varasemad andmed kontrollaine kohta näitavad, et valitud lahustil ei ole kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.4.3. **Menetlus**

1.4.3.1. *Vastuvõtlikkus uuritavale ainele*

Rakukultuure manustatakse uuritavale ainele koos metaboolse aktiveerimisega ja ilma selleta. Manustamisaeg peab olema sobiv (efektiivne aeg on tavaliselt 3-6 tundi). Manustamist võidakse jätkata ühe või mitme rakutsükli jooksul.

Igal uuritaval kontsentratsioonil võib kasutada kas kahte paralleelset või ühte kultuuri. Kui kasutatakse üksikkultuure, peaks kontsentratsioonide arv tõusma, et tagada analüüsitavate kultuuride piisav arv (nt vähemalt 8 analüüsitavat kontsentratsiooni). Tuleks kasutada paralleelseid negatiivseid (lahusti) kontrollkultuure.

Gaasilisi või lenduvaid aineid uuritakse sobiva meetodi abil, näiteks suletud kasvuanumates (21) (22).

1.4.3.2. *Ellujäämise, elujõulisuse ja mutatsioonisageduse mõõtmine*

Manustamisperioodi lõpus rakud pestakse ja kultiveeritakse ellujäämise määramiseks ja mutantse fenotüübi avaldumise võimaldamiseks. Tsütotoksilisuse suhtelise kloonimisefektiivsuse (ellujäämise) või suhtelise rakkude kogukasvu mõõtmise määramine algatatakse tavaliselt pärast manustamisperioodi.

Iga lookus on kindlaksmääratud minimaalse ajaga, et värskelt põhjustatud mutantide fenotüüpide avaldumine oleks lähedal optimaalsele (HPRT ja XPRT eeldab vähemalt 6–8 päeva ja TK vähemalt kahte päeva). Rakud kasvatakse selektiivse(te) aine(te)ga söötmes mutantide arvu ja ilma selektiivse(te) aine(te)ta söötmes kloonimisefektiivsuse määramiseks. Elujõulisuse mõõtmine (kasutatakse mutatsioonisageduse arvutamiseks) algatatakse avaldumisaja lõpus, asetades rakke mitteselektiivsesse söötmesse.

Kui uuritav aine on positiivne L5178Y $TK^{+/-}$ katses, tuleks kolooniate arv määrata vähemalt ühes uuritavas kultuuris (suurim positiivne kontsentratsioon) ning negatiivsetes ja positiivsetes kontrollides. Kui uuritav aine on negatiivne L5178Y $TK^{+/-}$ katses, tuleks kolooniate arv määrata negatiivsetes ja positiivsetes kontrollides. Uurimustes, kus kasutatakse TK6$TK^{+/-}$, võidakse samuti kolooniate arvu määrata.

2. TULEMUSED

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tulemuste hulgas peaksid olema tsütotoksilisuse ja elujõulisuse määramine, kolooniate arv ja mutatsioonisagedused katse- ja kontrollkultuuride kohta. L5178Y $TK^{+/-}$ katse positiivse vastuse korral loendatakse kolooniad, kasutades selles väikeste või suurte kolooniate kriteeriume uuritava aine vähemalt ühel kontsentratsioonil (suurim positiivne kontsentratsioon) ning negatiivses ja positiivses kontrollis. Nii suurte kui ka väikeste kolooniate mutantide molekulaarset ja tsütogeenilist olemust on uuritud täpsemalt (23) (24). $TK^{+/-}$ katses loendatakse kolooniad, kasutades normaalse kasvuga (suurte) ja aeglase kasvuga (väikeste) kolooniate kriteeriumeid (25). Mutantsed rakud, millel on kõige ulatuslikum geneetiline kahjustus, on pikendanud kahekordistumise aega ja seetõttu moodustavad väikeseid kolooniaid. Kõnealune kahjustus ulatub tüüpiliselt kogu geeni kaotamisest kuni karüotüüpiliselt nähtavate kromosoomide aberratsioonideni. Väikese koloonia mutantide moodustamine on seotud keemiliste ainetega, mis põhjustavad suuri kromosoomaberratsioone (26). Vähem tõsiselt mõjutatud mutantrakud kasvavad kiirusel, mis on sarnane parentaalsetele rakkudele, ja moodustavad suuri kolooniaid.

Ellujäämine (suhtelise kloonimisefektiivsused) või suhteline kogukasv on ära toodud. Mutatsioonisagedust väljendatakse mutantrakkude arvuga ellujäänud rakkude arvu kohta.

Tulemused esitatakse iga üksiku kultuuri kohta. Lisaks esitatakse kokkuvõte kõikidest tulemustest tabeli kujul.

Selget positiivset vastust ei ole vaja kontrollida. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel meelepäraselt muudetud katsetingimustes. Negatiivseid tulemusi kinnitatakse igal üksikjuhul eraldi. Neil juhtudel, kui negatiivsete tulemuste kinnitamist ei peeta vajalikuks, esitatakse põhjendus. Katse parameetrite muutmist hinnatud tingimuste vahemiku suurendamiseks tuleks arvesse võtta ebaselgete või negatiivsete tulemuste järelkatsetel. Katse parameetrite, mida võidakse muuta, hulka kuuluvad kontsentratsioonivahemik ja metaboolse aktiveerimise tingimused.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

On mitmeid kriteeriume positiivse tulemuse määramiseks, nagu nt mutatsioonisageduse kontsentratsiooniga seotud suurenemine või paljundamine. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel. Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks.

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas katses.

Kuigi enamikel katsetel on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

Positiivsed tulemused *in vitro* imetajate rakkude geenimutatsiooni katses viitavad sellele, et uuritav aine põhjustab geenimutatsioone kasutatud kultiveeritud imetajate rakkudes. Paljundatav positiivne kontsentratsiooni ja toime suhe on kõige tähelepanuväärsem. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et katsetingimuste põhjal ei põhjusta uuritav aine geenimutatsioone kasutatud kultiveeritud imetajate rakkudes.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab hõlmama järgmist teavet:

Lahusti/kandjaaine:

— kandjaaine/lahusti valiku põhjendamine,

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Rakud:

— rakkude tüüp ja allikas,

— rakukultuuride arv,

— raku passaažide arv, vajaduse korral,

— rakukultuuri säilitamise meetodid, vajaduse korral,

— mükoplasma puudumine.

Katsetingimused:

— kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sh nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud, kui need on olemas,

— kasvukeskkonna koostis, CO_2 kontsentratsioon,

— uuritava aine kontsentratsioon,

— lisatud kandjaaine ja uuritava aine hulk,

— inkubatsioonitemperatuur,

— inkubatsiooniaeg,

— manustamise kestus,

— rakutihedus manustamise ajal,

— metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle heakskiitmise kriteeriumid,

— positiivsed ja negatiivsed kontrollid,

— avaldumisperioodi pikkus (sh külvatud rakkude arv, subkultuurid ja söötmiskavad, vajadusel),

— selektiivsed ained,

— kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks,

— meetodid elujõuliste ja mutantrakkude loendamiseks,

— kolooniate kindlakstegemine, kus kolooniate arvu ja tüüpi võetakse arvesse (sh "väikeste" ja "suurte" kolooniate kriteeriumid, vajaduse korral).

Tulemused:

— toksilisuse tunnused,

— sadestuse tunnused,

— teave pH ja osmolaalsuse kohta uuritavale ainele vastuvõtlikkuse ajal, kui see on määratud,

— koloonia suurus, kui see on arvutatud vähemalt negatiivsetest ja positiivsetest kontrollidest,

— labori valmisolek väikeste mutantide kolooniate avastamiseks L5178Y $TK^{+/-}$ süsteemi abil, vajaduse korral,

— doosi ja toime suhe, võimaluse korral,

— võimalikud statistilised analüüsid,

— paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide tulemused,

— varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed.

— mutatsioonisagedus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindal, K. R. (eds.) (1987), Banbury Report 28; *Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E. H. Y. and Malling H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro, Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 61, pp. 1306–1312.

(3) Liber, H. L. and Thilly, W. G. (1982), Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts, *Mutation Res.* 94, pp. 467–485.

(4) Moore, M. M., Harington-Brock, K., Doerr, C. L. and Dearfield, K. L. (1989), Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci, *Mutagenesis*, 4, pp. 394–403.

(5) Aaron, C. S., and Stankowski, Jr. L. F., (1989), Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates, *Mutation Res.* 223, pp. 121–128.

(6) Aaron, C. S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H. R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L. F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.* 312, pp. 235–239.

(7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.* 257, pp. 147–204.

(8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 115, pp. 225–251.

(9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17–36.

(10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135–141.

(11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9–17.

(12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate — and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133–147.

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/$TK^{+/-}$ — $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239–268.

(14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, pp. 66–101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccoro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, pp. 365–373.

(16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31, pp. 347–364.

(17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/$TK^{+/-}$ — Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, pp. 61–108.

(18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, pp. 173–215.

(19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis* 7, pp. 175–177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polycholrinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85–88.

(21) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Ticc, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91–103.

(22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795–801.

(23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 87, pp. 51–55.

(24) Moore, M. M., Clive, D. Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluoronthymidine, Resistant (TFT^{+}) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ — Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 161–174.

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.* 229, pp. 89–102.

(26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/$TK^{+/-}$ — 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*, 5, pp. 609–614."

LISA 4F

"B.23. IMETAJATE SPERMATOGOONIDE KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 483, *Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test* (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

In vivo imetajate spermatogoonide kromosoomaberratsioonide katse eesmärk on ära tunda need ained, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone imetajate spermatogoonide rakkudes (1) (2) (3) (4) (5). Struktuursed aberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. Keemiliste mutageenide põhjustatud aberratsioonid on enamuses kromatiidaberratsioonid, aga esineb ka kromosoomaberratsioone. Käesolev meetod ei ole siiski määratud mõõtma numbrilisi aberratsioone ja seda ei kasutata korrapäraselt sel eesmärgil. Kromosoommutatsioonid ja sellega seotud juhud on paljude inimeste geneetiliste haiguste põhjuseks.

Käesolev katse mõõdab kromosoomaberratsioone spermatogoonide idurakkudes ja seetõttu oodatakse, et need ennustaksid idurakkudes pärinevaid mutatsioone.

Käesolevas katses kasutatakse tavaliselt närilisi. Käesolev *in vivo* tsütogeneetiline katse avastab kromosoomaberratsioonid spermatogoonide mitoosides. Käesolevat meetodit ei kasutata muudes sihtkudedes.

Et avastada kromatiidaberratsioone spermatogoonide rakkudes, tuleks uurida esimest mitoosiraku jagunemist manustamise järel enne, kui need kahjustused kaovad järgmistes raku jagunemistes. Lisateavet manustatud spermatogoonide tüverakkudest saadakse meiootilise kromosoomi analüüsil kromosoomaberratsioonide suhtes diakineesi-metafaasis I, kui manustatud rakud muutuvad spermatotsüütideks.

Käesolev *in vivo* katse on määratud uurima, kas keharakkude mutageenid on ka aktiivsed idurakkudes. Lisaks sobib spermatogoonidega tehtav katse ka mutageensuse ohu hindamiseks, kuna see võimaldab *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA parandusprotsesside tegurite arvessevõtmist.

Munandites on mitu spermatogoonide põlvkonda, mille tundlikkus keemiliste ainete mõjule vaheldub. Seetõttu esindavad avastatud aberratsioonid töödeldud spermatogoonide rakupopulatsioonide koguvastust, milles domineerib suurem hulk eristunud spermatogoonide rakke. Eri põlvkondadesse kuuluvate spermatogoonide kuulumine üldvereringesse sõltub nende asukohast munandites.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine või reaktiivne metaboliit ei pääse sihtkoesse, ei ole asjakohane kasutada käesolevat katset.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Kromatiidaberratsioon: struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb üksikute kromatiidide katkemises või kromatiidide vahelises katkemises või taasühinemises.

Kromosoomaberratsioon: struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb mõlema kromosoomi katkemises või katkemises ja taasühinemises samas kohas.

Tühik: akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millel on minimaalne kromatiidide üleminek.

Numbriline aberratsioon: kasutatud rakkude tüüpilisest normaalsest kromosoomiarvust erinev kromosoomide arv.

Polüploidsus: haploidse kromosoomiarvu (*n*) paljukordsus, v.a diploidne arv (nt 3*n*, 4*n* jne).

Struktuurne aberratsioon: kromosoomistruktuuri muutus, mis on avastatud rakujaotuse metafaasi faasi mikroskoopilisel uurimisel ja mida täheldatakse deletsiooni ja fragmentidena, kromosoomisiseste või -väliste muutustena.

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Loomadele manustatakse uuritavat ainet, kasutades sobivat manustamisteed, ja tapetakse sobiva aja möödumisel manustamisest. Enne tapmist antakse loomadele metafaasi peatavat ainet (nt kolhitsiini või Colcemid®-i). Seejärel tehakse idurakkudest kromosoomipreparaadid ja need värvitakse ning metafaasi rakkude kromosoomaberratsioone analüüsitakse.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Preparaadid**

1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Enamasti kasutatakse isaseid hiina hamstreid ja hiiri. Võib kasutada ka muude sobivate imetajate liikide isaseid loomi. Rakendatakse noorte tervete loomade enimkasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade kaalumuutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ±20 % keskmisest kaalust.

1.4.1.2. *Elamis- ja söötmistingimused*

Üldise sissejuhatuse B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi niiskuse eesmärk peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. *Loomade ettevalmistamine*

Terved noored täiskasvanud isasloomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viis päeva enne uuringu alustamist.

1.4.1.4. *Annuste ettevalmistamine*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendatakse enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on lubatav.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate annuste korral ja ei tohi astuda keemilisse reaktsiooni uuritava ainega. Kui kasutatakse muid kui tuntud lahusteid/kandjaaineid, peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahustite/-kandjaainete kasutamist.

1.4.2.2. *Kontrollid*

Käesolevasse katsesse kaasatakse paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neile ei anta uuritavat ainet.

Positiivsed kontrollid ei tohiks põhjustada struktuurseid aberratsioone *in vivo* spermatogoonide rakkudes manustamistasemetel, mis peaksid põhjustama avastatavat suurenemist taustaga võrreldes.

Positiivsete kontrollainete annused valitakse nii, et mõjud on selged, kuid need ei paljasta lugejale koheselt kodeeritud objektiklaaside identiteeti. On aktsepteeritav, et positiivsed kontrollid võivad kasutada erinevaid manustamisteid kui uuritav aine ja proovid võetakse üksnes korra. Keemiliste ainete rühmaga seotud

positiivsete keemiliste kontrollainete kasutamist tuleks kaaluda, kui sellised ained on kättesaadavad. Positiivsete kontrollainete näited:

Aine	CAS nr	EINECSi nr
Tsüklofosfamiid Tsüklofosfamiid monohüdraat	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Tsükloheksüülamiin	108-91-8	203-629-0
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
Akrüülamiid monomeer	79-06-1	201-173-7
Trietüleen-melamiin	51-18-3	200-083-5

Üksnes lahustit või kandjaainet saanud või muul katserühmale sarnasel viisil töödeldud negatiivsetest kontrollidest võetakse proovid igal proovivõtukorral, välja arvatud siis, kui varasemad kontrollitulemused näitavad loomade väliste varieerumiste ja kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude esinemissageduste tunnustamist. Lisaks sellele käsitletakse ka töötlemata kontrolle, välja arvatud juhul, kui varasemad või avaldatud andmed kontrolli kohta näitavad, et valitud lahustil/kandjaainel ei ole kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.5. MENETLUS

1.5.1. **Loomade arv**

Nii katse- kui kontrollrühmas on vähemalt viis analüüsitavat looma.

1.5.2. **Manustamiskava**

Uuritavaid aineid manustatakse eelistatult ühel või kahel korral (nt ühekordse annusena või kahekordsete annustena). Uuritavaid aineid võib anda ka jagatud annustena, näiteks kaks annust ühel päeval kuni mõnetunnise vahega, et hõlbustada suurte ainekoguste andmist. Muud manustamiskavad peaksid olema teaduslikult tõestatud.

Suurimat annust saavas rühmas võetakse manustamise järel proove kahel korral. Kuna uuritav aine saab mõjutada rakutsükli kineetikat, siis võetakse proove üks kord varajasel ja teine kord hilisemal ajal ligikaudu 24–48 tunni jooksul pärast manustamist. Muude annuste, v.a suurim annus, puhul on proovide võtmise ajaks 24 tundi või 1,5 rakutsüklit pärast manustamist, välja arvatud siis, kui muu proovivõtuaeg on sobivam mõjude avastamiseks (6).

Lisaks võib kasutada muid proovivõtuaegasid. Näiteks, keemiliste ainete puhul, mis võivad põhjustada kromosoomi aeglustumist (*lagging*), või võivad esile tuua S-faasist sõltumatuid mõjusid, on sobivam varajasem proovide võtmise aeg (1).

Kordusmanustamiste sobivus tuleb määrata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Kordusmanustamise järel tuleb loomad tappa 24 tunni (1,5 rakutsükli) jooksul pärast viimast manustamist. Täiendavaid proovivõtuaegasid võib kasutada vajaduse korral.

Enne tapmist süstitakse loomade kõhukelmesse metafaasi peatavat ainet (nt Colcemid®-i või kolhitsiini). Loomadelt võetakse seejärel proovid sobiva intervalli järel. Hiirte puhul on see intervall ligikaudu 3–5 tundi, hiina hamstritel ligikaudu 4–5 tundi.

1.5.3. **Annused**

Kui tehakse annuste vahemiku määramiseks uuring sobivate andmete puudumisel, siis tehakse uurimus samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuurimuses (7). Kui esineb mürgisus, kasutatakse kolme erinevat annust esimesest proovivõtust alates. Need annused peaksid hõlmama vahemikku suurimast kuni väiksema mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni. Hilisemal proovivõtuajal on vaja kasutada üksnes suurimat annust. Suurim annus määratakse annusena, mis põhjustab sarnaseid mürgisusenähte, et samale manustamisrežiimile põhinevate suuremate annuste kasutamine võib põhjustada surma.

Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Suurim annus võib samuti põhjustada toksilisuse nähte spermatogoonide rakkudes (nt spermatogoonide mitooside suhe esimese ja teise meiootilisse metafaasi on vähenenud; kõnealune vähenemine ei tohi ületada 50 %).

1.5.4. **Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt seotud ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uurimust vajalikuks. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. **Manustamine**

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil või süstides kõhuõõnde. Samuti võib muid manustamisteid aktsepteerida, kui need on põhjendatud. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehakaalu kohta. Suurimate koguste kasutamine peab olema põhjendatud. Välja arvatud ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

1.5.6. **Kromosoomipreparaat**

Koheselt pärast tapmist võetakse rakususpensioonid ühest või mõlemast munandist, mis pannakse hüpotoonilisse lahusesse ja fikseeritakse. Seejärel rakud asetatakse objektiklaasidele ja värvitakse.

1.5.7. **Analüüs**

Iga looma puhul analüüsitakse vähemalt 100 väga levinud metafaasi (vähem kui 500 metafaasi rühma kohta). Seda arvu saab vähendada, kui esineb palju aberratsioone. Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollide omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kui fikseerimise menetlused viivad tihti metafaasis olevate rakkude katkemise ja kromosoomide kaotamiseni, peaksid arvutatud rakud sisaldama tsentromeeride hulka, mis vastab arvule $2n \pm 2$.

2. **TULEMUSED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Üksikute loomade andmed esitatakse tabeli kujul. Katseühikuks on loom. Iga üksiku looma puhul hinnatakse struktuurseid kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arvu ja kromosoomaberratsioonide arvu raku kohta. Eri tüüpi struktuursed kromosoomaberratsioonid tuleks loetleda ning mainitakse nende arvud ja esinemissagedused katse- ja kontrollkultuurides. Tühikud (*gaps*) registreeritakse eraldi ja nende kohta antakse teavet, aga üldiselt ei kuulu need aberratsioonide üldsageduse hulka.

Kui vaadeldakse nii meioosi kui mitoosi, tuleks määrata kindlaks spermatogoonide mitooside suhe esimesse ja teise meiootilisse metafaasi tsütotoksilisuse mõõduna kõikidest uuritavale ainele vastuvõtlikest loomadest ja negatiivsetest kontrollidest kokku 100 jaguneva rakuga proovis looma kohta võimalikule tsütotoksilisele mõjule osutamiseks. Kui üksnes mitoosi vaadeldakse, tuleks määrata mitootiline indeks vähemalt 1 000 rakust iga looma kohta.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse saamiseks on mitmeid kriteeriume, nt kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude suhtelise arvu annusest tingitud suurenemine või kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arvu selge suurenemine ühes annuses ühel proovivõtuajal. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (8). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel ootuspäraselt muudetud katsetingimustes.

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas katses.

Kuigi enamikel katsetel on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

In vivo kromosoomaberratsiooni katsel saadud positiivsed tulemused viitavad sellele, et aine põhjustab struktuurseid kromosoomaberratsioone uuritud liikide idurakkudes. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et katsetingimuste põhjal ei põhjusta aine kromosoomaberratsioone uuritud liikide idurakkudes.

Tõenäosust, et uuritav aine või selle metaboliidid jõuavad sihtkoesse, tuleks arutada.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab hõlmama järgmist teavet:

Lahusti/kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendamine,

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved,

— loomade arv ja vanus,

— päritolu, elamistingimused, toitumine jne,

— loomade individuaalne kaal katse alustamisel, sh kehakaalu vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

— annuse määramise katse tulemused, kui need on läbi viidud,

— annuste valiku põhimõtted,

— manustamistee,

— uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad,

— uuritava aine manustamise üksikasjad,

— tapmisaja põhjendused,

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehakaalu kohta päevas), vajaduse korral,

— üksikasjad toidu- ja veekvaliteedi kohta,

— manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus,

— toksilisuse mõõtmise meetodid,

— metafaasi peatav aine, selle kontsentratsioon ja manustamise kestus,

— objektiklaaside valmistamise meetodid,

— aberratsioonide loendamise kriteeriumid,

— analüüsitud rakkude arv looma kohta,

— kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

— toksilisuse tunnused,

— mitootiline indeks,

— spermatogoonide mitoosirakkude suhe esimesse ja teise meiootilisse metafaasi,

— aberratsioonide tüüp ja arv, antud iga looma kohta eraldi,

— aberratsioonide koguarv rühma kohta,

— aberratsioone sisaldavate rakkude arv rühma kohta,

— doosi ja toime suhe, võimaluse korral,

— võimalikud statistilised analüüsid,

— paralleelsed negatiivse kontrolli tulemused,

— varasemad negatiivsest kontrollist saadud tulemused ning vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed,

— paralleelse positiivse kontrolli tulemused,

— ploidsuse muutused, kui neid esineb.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

(1) Adler, I. D., (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, in: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: *Genetic Effects and Applied Mutagenesis*, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (eds) Liss, New York, pp. 477–484.

(2) Adler, I. D., (1984), Cytogenetic tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing*: a Practical Approach, (ed.) S. Venitt and J. M. Parry, IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275–306.

(3) Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E. (1964), An Air-drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 3, pp. 289–294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115–141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207–209.

(6) Adler, I. D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313–318.

(7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313–319.

(8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage J. R. K. (1989), Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184–232.”

LISA 4G

"B.39. PLAANIVÄLINE DNA SÜNTEESI (UDS) KATSE IMETAJATE MAKSARAKKUDEGA *IN VIVO*

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Plaanivälise DNA sünteesi (UDS) katse imetajate maksarakkudega *in vivo* eesmärk on identifitseerida katseained, mis põhjustavad DNA parandust katseloomade maksarakkudes (1) (2) (3) (4).

Käesolev *in vivo* katse on meetod keemiliste ainete genotoksiliste mõjude uurimiseks maksas. Mõõdetud lõpp-punkt ilmneb DNA kahjustuses ja selle hilisemas parandamises maksarakkudes. Maks on tavaliselt imendunud ühendite ainevahetuse peamine koht. See on seega sobiv koht DNA kahjustuse mõõtmiseks *in vivo*.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine ei pääse sihtkoesse, siis ei ole vaja kasutada käesolevat katset.

Plaanivälise DNA sünteesi (UDS) lõpp-punkt mõõdetakse määrates märgistatud nukleosiidide ühinemist S-faasi DNA sünteesi väliste rakkudega. Enimkasutatav meetod on triitiumiga märgistatud tümidiini (^{3}H-TdR) ühinemise määramine autoradiograafiliselt. *In vivo* UDS-katsetes kasutatakse eelistatult rotimaksasid. Võib kasutada ka muid kudesid peale maksa, kuid neid ei kirjeldata käesolevas meetodis.

UDS-vastuse avastamine sõltub väljalõigatud ja asendatud DNA aluste arvust kahjustuse kohas. Seega on UDS-katse eriti väärtuslik ainetest põhjustatud "pikkade DNA osade paranduse" ("*longpatch repair*") avastamiseks (20-30 alust). "Lühikeste osade parandus" ("*shortpatch repair*") (1–3 alust) avastatakse palju väiksema tundlikkusega. Lisaks võivad mutageensed muutused aset leida DNA kahjustuste parandamata jätmisel, parandamisvigade või replikatsioonivigade tegemisel. UDS-vastuse ulatus ei viita parandusprotsessi usaldusväärsusele. Lisaks on võimalik, et mutageen reageerib DNA-ga, aga DNA kahjustust ei parandata lõikamis-parandamisprotsessi kaudu. Kuna lõpp-punkt mõõdetakse kogu genoomist, siis potentsiaalne tundlikkus korvab selle, et UDS-katse ei anna spetsiifilist teavet mutageense aktiivsuse kohta.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Parandatavad rakud: osakeste netoarv tuumas ehk NNG-väärtus on suurem kui arvestuslik väärtus, mida on põhjendatud katset läbiviivas laboris.

NNG-väärtus (*net nuclear grains*): rakkude UDS-aktiivsuse kvantitatiivne mõõtmine autoradiograafilistes UDS-katsetes, arvutatuna tuumale vastavatel tsütoplasma aladel (CG) tsütoplasma osakeste keskmise arvu mahaarvamisel tuumaosakeste arvust (NG): NNG = NG – CG. NNG-arvud arvutatakse üksikute rakkude kohta ja seejärel pannakse rakud kultuuris, paralleelsetes kultuurides jm kokku.

Plaaniväline DNA süntees (UDS): DNA parandussüntees pärast seda, kui keemiliste ainete või füüsikaliste mõjurite põhjustatud kahjustuse alal sisalduva DNA osa on lahti lõigatud ja eemaldatud kromosoomist.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

UDS-katse imetajate maksarakkudega *in vivo* viitab DNA parandussünteesile pärast seda, kui keemiliste ainete või füüsikaliste mõjurite põhjustatud kahjustuse alal sisalduva DNA osa on lahti lõigatud ja eemaldatud kromosoomist. Katse põhineb enamasti ^{3}H-TdR lisamisel maksarakkude DNA-sse, millel on üksnes väike rakutsükli S-faasis olevate rakkude esinemissagedus. ^{3}H-TdR lisamine määratakse tavaliselt autoradiograafiliselt, kuna kõnealune tehnika ei ole vastuvõtlik S-faasis olevatele rakkudele, nagu nt vedeliktsintsillatsiooniloendus.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Preparaadid**

1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Tavaliselt kasutatakse rotte, kuigi võib kasutada mis tahes sobivaid imetajate liike. Rakendatakse noorte tervete loomade enimkasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade kaalumuutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ± 20 % iga soo keskmisest kaalust.

1.4.1.2. *Elamis- ja söötmistingimused*

Üldise sissejuhatuse B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi niiskuse eesmärk peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. *Loomade ettevalmistamine*

Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt ja hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne uurimuse alustamist, et võimaldada laboritingimustega kohanemist.

1.4.1.4. *Uuritav aine/preparaat*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendatakse enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**

1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate annuste korral ja ei tohi astuda keemilise reaktsiooni uuritava ainega. Kui kasutatakse muud kui tuntud lahustit/kandjaainet, peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitatav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahustite/-kandjaainete kasutamist.

1.4.2.2. *Kontrollid*

Igasse sõltumatult läbiviidud katseossa kaasatakse paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neid ei töödelda uuritava ainega.

Positiivsed kontrollid peaksid olema ained, mis teatavasti põhjustavad UDS-i, kui neid antakse annustena, mis ootuspäraselt põhjustavad avastatavat suurenemist taustaga võrreldes. Metaboolset aktiveerimist vajavaid positiivseid kontrolle tuleks kasutada annustena, mis annavad mõõduka vastuse (4). Annused valitakse nii, et mõjud on selged, kuid need ei paljasta lugejale koheselt kodeeritud objektiklaaside identiteeti. Positiivsete kontrollainete näited:

Proovivõtuaeg	Aine	CAS nr	EINECSi nr
Varane proovivõtuaeg (2–4 tundi)	Dimetüülnitrosoamiin	62-75-9	200-249-8
Hiline proovivõtuaeg (12–16 tundi)	N-2-atsetamiid-fluor (2AAF)	53-96-3	200-188-6

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivseid kontrollaineid. Positiivseid kontrollaineid võib manustada uuritavast ainest erineva manustamistee kaudu.

1.5. MENETLUS

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Katseloomade arv peaks olema piisav katsevastuses loodusliku bioloogilise varieerumise arvessevõtmiseks. Analüüsitavaid loomi peaks olema vähemalt kolm rühma kohta. Kui märkimisväärne andmebaas on kogutud juba varem, paralleelsete negatiivsete või positiivsete kontrollrühmade jaoks on vaja üksnes üks või kaks looma.

Üksnes üht sugupoolt, eelistatult isasloomasid, võidakse kasutada, kui uurimuse ajal on kättesaadavad tulemused samas liigis ja sama vastuvõtlikkuse liini kasutades tehtud uurimuste kohta, mille tulemused näitavad, et toksilisuse osas ei ole märkimisväärseid erinevusi sugupoolte vahel. Kui inimese vastuvõtlikkus kemikaalidele on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse sobivast soost loomadega.

1.5.2. **Manustamiskava**

Uuritavaid ained tuleb üldiselt anda ühekordse annusena.

1.5.3. **Annused**

Normaalselt kasutatakse vähemalt kaht erinevat annust. Suurim annus määratletakse annusena, mis põhjustab sarnaseid mürgisusenähte, et samale manustamiskavale põhinevate suuremate annuste puhul võib tulemuseks olla surm. Üldiselt peaksid väiksemad annused olema 50–25 % suurest annusest.

Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Kui tehakse annuse määramiseks uurimus sobivate andmete puudumisel, siis tehakse uurimus samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuurimuses.

Suurim annus võidakse samuti määratleda annusena, mis viitab toksilisusele maksas (nt püknootiline tuum).

1.5.4. **Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt seotud ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uurimust vajalikuks. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. **Manustamine**

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Samuti võib muid manustamisteid kasutada, kui need on põhjendatud. Kõhukelmesisest teed siiski ei soovitata, kuna maks on sel juhul uuritavale ainele vahetult vastuvõtlikum kui vereringe kaudu. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehakaalu kohta. Suurimate koguste kasutamine peab olema põhjendatud. Arvesse võtmata ärritavaid või söövitavaid aineid, mille mõjud tavaliselt halvenevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

1.5.6. **Maksarakkude preparaadid**

Maksarakud prepareeritakse uuritavat ainet saanud loomadelt tavaliselt 12–16 tundi pärast annustamist. Täiendav varasem proovivõtuaeg (tavaliselt kaks kuni neli tundi manustamisjärgselt) on üldiselt vajalik, välja arvatud juhul, kui on saadud selge positiivne vastus 12–16 tunni jooksul. Muid proovivõtuaegasid võib kasutada, kui need on põhjendatud toksokineetiliste andmete põhjal.

Imetajate maksarakkude lühiajalised kultuurid tehakse tavaliselt selleks, et perforeerida maksa kollagenaasiga *in situ* ja võimaldada värskelt eraldunud maksarakkudel end kinnitada sobivale pinnasele. Negatiivsetelt kontroll-loomadelt pärit maksarakkudel peaks olema elujõulisus (5) vähemalt 50 %.

1.5.7. **UDS-määramine**

Värskelt isoleeritud imetajate maksarakud inkubeeritakse tavaliselt keskkonnas, mis sisaldab ^{3}H-TdR-i, sobiva pikkusega aja jooksul, nt kolm kuni kaheksa tundi. Inkubatsiooniperioodi lõpus tuleks sööde eraldada rakkudest, mida võidakse seejärel inkubeerida söötmes, mis sisaldab liiga palju märgistamata tümidiini inkorporeerimata radioaktiivsuse vähendamiseks (“*cold chase*”). Seejärel rakud loputatakse, fikseeritakse ja kuivatatakse. Pikema inkubatsiooniaja jooksul ei pruugi märgistamata tümidiiniga töötlemine olla vajalik. Objektiklaasid kastetakse autoradiograafilise emulsiooni sisse, valgustatakse pimedas (säilitatakse külmkapis 7–14 päeva), ilmutatakse, värvitakse ning arvutatakse valgustatud hõbeosakesed. Kaks kuni kolm objektiklaasi valmistatakse iga looma kohta.

1.5.8. **Analüüs**

Objektiklaasi preparaadid peaksid sisaldama piisavalt rakke, mille morfoloogia on normaalne, milles võimaldatakse teha UDS-i tähendusrikast hindamist. Preparaate uuritakse mikroskoopiliselt ilmsete tsütotoksiliste tunnuste suhtes (nt püknoos, radiomärgistuse vähenemine).

Objektiklaasid kodeeritakse enne osakeste kokkulugemist. Tavaliselt igast loomast loetletakse 100 rakku vähemalt kahelt objektiklaasilt. Vähem kui 100 raku/loom loendamine peab olema põhjendatud. Osakeste arvu ei arvutata S-faasis olevast tuumast, kuid S-faasi rakkude osa registreeritakse.

Morfoloogiliselt normaalsete rakkude tuuma ja tsütoplasmasse inkorporeeritud ^{3}H-TdR hulk, mida nähakse hõbeosakeste sadestumisel, määratakse sobivate meetodite abil.

2. **TULEMUSED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tuleb esitada individuaalsed objektiklaasi ja loomade andmed. Lisaks esitatakse kokkuvõte kõikidest tulemustest tabeli kujul. NNG-arvud arvutatakse iga raku, iga looma, iga annuse ja aja kohta CG-arvude mahaarvamisel NG-arvudest. Kui arvutatakse “parandatavate rakkude” arvu, peaks “parandatavate rakkude” määratlemine olema põhjendatud ja põhinema varasemate ja paralleelsete negatiivsete kontrollide andmetel. Numbrilisi tulemusi hinnatakse statistiliste meetodite abil. Kui statistilisi katseid kasutatakse, valitakse ja põhjendatakse neid enne uurimuse läbiviimist.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivsete/negatiivsete vastuste kriteeriumide näited hõlmavad:

positiivne	i)	NNG-väärtused on suuremad kui arvestuslik lävi, mis on õigustatud varasemate laboriandmete põhjal;
või	ii)	NNG väärtused on oluliselt suuremad kui paralleelsetes kontrollkatsetes;
negatiivne	i)	NNG väärtused on varasema kontroll-läve piires või sellest väiksemad;
või	ii)	NNG väärtused ei ole oluliselt suuremad kui paralleelsetes kontrollkatsetes.

Tulemuste bioloogilist olulisust arutatakse: nt loomade väliste varieerumiste, doosi ja toime suhte ja tsütotoksilisuse parameetreid tuleks arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel. Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse saamiseks.

Kuigi enamikel katsetel on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

UDS-katse imetajate maksarakkudega *in vivo* positiivne tulemus viitab sellele, et uuritav aine põhjustab DNA kahjustuse imetajate maksarakkudes *in vivo*, mida saab parandada plaanivälise DNA sünteesi *in vitro* abil. Negatiivne tulemus viitab sellele, et uuritav aine ei põhjusta katsetingimustes DNA kahjustust, mis oleks käesolevas katses avastatav.

Tõenäosust, et uuritav aine jõuab üldisesse vereringesse või eriti sihtkoesse (nt süsteemne toksilisus), tuleks arutada.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab järgmisi andmeid:

Kandjaaine:

— kandjaaine valiku põhjendamine,

— uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved,

— loomade arv, vanus ja sugu,

— päritolu, elamistingimused, toitumine jne,

— loomade individuaalne kaal katse alustamisel, sh kehakaalu vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

— positiivsed ja negatiivsed (kandjaaine/lahus) kontrollid,

— annuse määramise katse tulemused, kui need on läbi viidud,

— annuste valiku põhimõtted,

— uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad,

— uuritava aine manustamise üksikasjad,

— manustamistee,

— meetodid, mis kinnitavad, et uuritav aine jõuab üldvereringesse või sihtkoesse, vajaduse korral,

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehakaalu kohta päevas), vajaduse korral,

— üksikasjad toidu- ja veekvaliteedi kohta,

— manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus,

— toksilisuse mõõtmise meetodid,

— maksarakkude preparaatide ja kultuuride valmistamise meetod,

— kasutatud autoradiograafiline tehnika,

— prepareeritud objektiklaaside arv ja loendatud rakkude arv,

— hindamiskriteeriumid,

— kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

— tuumas olevate osakeste, tsütoplasmas olevate osakeste ja osakeste koguarvu tuumas keskväärtused üksikute objektiklaaside, loomade ja rühma kohta,

— doosi ja toime suhe, võimaluse korral,

— võimalikud statistilised analüüsid,

— toksilisuse tunnused,

— paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide tulemused,

— varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed,

— "parandatavate rakkude" arv, kui see on määratud,

— S-faasi rakkude arv, kui see on määratud,

— rakkude elujõulisus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused

4. **VIITED**

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the In Vivo Rat. Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 156, pp. 1–18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, Mutation Res., 189, pp. 123–133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52–77.

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla. G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, Mutation Res., 312, pp. 263–285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), Mutation Res., 291, pp. 21–27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepalocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553–562."

LISA 5

Vt komisjoni direktiiv 2001/59/EÜ, EÜT L 225, 21.8.2001, lk 1.

LISA 6

"IX LISA

A OSA

Lapsele avamatute kinnitustega seotud sätted

Lisaks käesoleva direktiivi artikli 22 lõike 1 punkti e sätetele varustatakse lapsele avamatute kinnitustega mis tahes mahuga pakendid, mis sisaldavad sissehingamisel ohtlikke aineid (Xn; R65) ning mis on liigitatud ja märgistatud vastavalt käesoleva direktiivi VI lisa lõikele 3.2.3, välja arvatud aerosoolina või kinnise pihustiga varustatud pakendis turuleviidavad ained.

1. *Korduvalt suletavad pakendid*

   Korduvalt suletavatel pakenditel kasutatavad lapsele avamatud kinnitused vastavad ISO standardile 8317 (1. juuli 1989. aasta väljaanne) "Laste eest kaitstud pakendid. Korduvalt suletavate pakendite nõuded ja teimismeetodid", mille on kinnitanud Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon (ISO).

2. *Ühekordselt suletavad pakendid*

   Ühekordselt suletavatel pakenditel kasutatavad lapsele avamatud kinnitused vastavad CEN-i standardile EN 862 (1997. aasta märtsi väljaanne) "Pakend. Laste eest kaitstud pakend. Mittefarmatseutiliste toodete ühekordselt suletavate pakendite nõuded ja teimimisprotseduurid", mille on kinnitanud Euroopa Standardiseerimiskomitee (CEN).

3. *Märkused*

   1. Eespool nimetatud standarditele vastavuse tõendeid võivad kinnitada ainult laboratooriumid, mis vastavad Euroopa standardite seeriale EN 45 000.

   2. Erijuhud

      Kui on ilmne, et pakend on laste jaoks piisavalt ohutu, sest nad ei pääse selle sisule ilma abivahendita ligi, ei ole vaja katset teha.

      Kõikidel teistel juhtudel ja kui on piisavalt alust kahelda kinnituse ohutuses lapse suhtes, võib siseriiklik asutus taotleda toote turustamise eest vastutavalt isikult laboratooriumi sertifikaati, mida on kirjeldatud punktis 3.1 ja milles on märgitud, et:

      — kinnituse liik on selline, et seda ei ole eespool osutatud ISO ja CEN-i standardite alusel vaja katsetada,

        või

      — kinnitust on katsetatud ja on leitud, et see vastab eespoolt osutatud standarditele.

B OSA

Kombatavate hoiatusmärkidega seotud sätted

Reljeefsete hoiatusmärkide tehnilised spetsifikatsiooni vastavad EN ISO standardile 11683 (1997. aasta väljaanne) "Pakend. Kombatavad ohumärgid. Nõuded"."