32000L0032

L 136/1 AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA 2000.6.8.

# A BIZOTTSÁG 2000/32/EK IRÁNYELVE
## (2000. május 19.)
## a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő huszonhatodik hozzáigazításáról (*)
## (EGT vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb az 1999/33/EK európai parlamenti és tanácsi irányelvvel [1] módosított, a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 1967. június 27-i 67/548/EGK tanácsi irányelvre [2] és különösen annak 28. cikkére,

mivel:

(1) A 67/548/EGK irányelv I. melléklete tartalmaz egy, a veszélyes anyagokat felsoroló listát, minden egyes anyag osztályozásának és címkézésének részleteivel együtt. A jelenlegi tudományos és műszaki ismeretek azt mutatják, hogy felül kell vizsgálni az e mellékletben közölt veszélyes anyagok listáját. Az irányelv egyes nyelvi változatai helyesbítést igényelnek az előszó és az I. melléklet A. táblázatának egyes részeiben.

(2) A 67/548/EGK irányelv III. melléklete tartalmazza a veszélyes anyagok és készítmények veszélyeinek/kockázatainak jellegét (R-mondatok). A 67/548/EGK irányelv IV. melléklete tartalmazza a veszélyes anyagok és készítmények biztonságos használatára vonatkozó útmutatásokat (S-mondatok). A 67/548/EGK irányelv VI. melléklete útmutatót tartalmaz a veszélyes anyagok és készítmények osztályozásához és címkézéséhez. Az irányelv egyes nyelvi változatai helyesbítést igényelnek a III., IV. és VI. melléklet egyes szakaszaiban.

(3) A 67/548/EGK irányelv V. melléklete megállapítja a veszélyes anyagok és készítmények fizikai-kémiai tulajdonságainak, toxicitásának és ökotoxicitásának meghatározására szolgáló módszereket. E mellékletet a műszaki fejlődéshez hozzá kell igazítani.

(4) A 67/548/EGK irányelv IX. melléklete tartalmazza a gyermekbiztos zárásra vonatkozó rendelkezéseket. E rendelkezéseket felül kell vizsgálni és naprakész állapotba kell hozni. A gyermekbiztos zárás alkalmazási körét ki kell terjeszteni.

(5) Ezen irányelv rendelkezései összhangban vannak a veszélyes anyagok és készítmények kereskedelme technikai akadályainak felszámolásáról szóló irányelveknek a műszaki fejlődéshez történő hozzáigazításával foglalkozó bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

*1. cikk*

A 67/548/EGK irányelv a következőképpen módosul:

1. Az I. melléklet a következőképpen módosul:

   a) Ezen irányelv 1. A. mellékletének Q. megjegyzése az előszóban lévő megfelelő megjegyzés helyébe lép.

   b) Ezen irányelv 1. B. mellékletében közölt sorok az A. táblázatban lévő megfelelő sorok helyébe lépnek.

   c) Ezen irányelv 1. C. mellékletében közölt tételek a megfelelő tételek helyébe lépnek.

   d) A szöveg ezen irányelv 1. D. mellékletében közölt megjegyzésekkel egészül ki.

2. Ezen irányelv 2. mellékletében szereplő R-mondat a III. mellékletben közölt megfelelő mondat helyébe lép.

3. A IV. melléklet a következőképpen módosul:

   a) Ezen irányelv 3. A. mellékletében közölt S-mondatok a IV. melléklet megfelelő mondatai helyébe lépnek.

(*) A 27. hozzáigazítás után került elfogadásra.
(1) HL L 199., 1999.7.30., 57.o.
(2) HL 196., 1967.8.16., 1.o.

b) Ezen irányelv 3. B. mellékletében közölt összetett S-mondatok a IV. mellékletben lévő megfelelő mondatok helyébe lépnek.

4. Az V. melléklet B. része a következőképpen módosul:

a) Ezen irányelv 4. A. mellékletében közölt szöveg a B.10. fejezet helyébe lép.

b) Ezen irányelv 4. B. mellékletében közölt szöveg a B.11. fejezet helyébe lép.

c) Ezen irányelv 4. C. mellékletében közölt szöveg a B.12. fejezet helyébe lép.

d) Ezen irányelv 4. D. mellékletében közölt szöveg a B.13. és B.14. fejezetek helyébe lép.

e) Ezen irányelv 4. E. mellékletében közölt szöveg a B.17. fejezet helyébe lép.

f) Ezen irányelv a 4. F. mellékletében közölt szöveg a B.23. fejezet helyébe lép. A magyarázó megjegyzésben a B.23. fejezet címe ennek megfelelően módosul.

g) Az irányelv kiegészül ezen irányelv a 4. G. mellékletében közölt szöveggel.

5. Az V. melléklet C. része általános bevezetésének negyedik francia bekezdését el kell hagyni.

6. Ezen irányelv 5. mellékletében közölt szövegek a VI. melléklet megfelelő szövegrészeinek helyébe lépnek.

7. A IX. melléklet ezen irányelv 6. mellékletében foglaltak szerint módosul.

*2. cikk*

(1) A tagállamok hatályba léptetik azokat a törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek legkésőbb 2001. június 1-jéig megfeleljenek. Erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot.

Amikor a tagállamok elfogadják ezeket az intézkedéseket, azokban hivatkozni kell erre az irányelvre, vagy azokhoz hivatalos kihirdetésük alkalmával ilyen hivatkozást kell fűzni. A hivatkozás módját a tagállamok határozzák meg.

(2) A tagállamok közlik a Bizottsággal nemzeti joguknak azokat a főbb rendelkezéseit, amelyeket az ezen irányelv által szabályozott területen fogadtak el, valamint a Bizottság számára megküldenek egy táblázatot ezen irányelv rendelkezései és az általuk kibocsátott nemzeti rendelkezések közötti megfelelésről.

*3. cikk*

Ez az irányelv az *Európai Közösségek Hivatalos Lapjában* való kihirdetését követő harmadik napon lép hatályba.

*4. cikk*

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 2000. május 19-én.

*a Bizottság részéről*

Margot WALLSTRÖM

*a Bizottság tagja*

*1. A. MELLÉKLET*

ELŐSZÓ AZ I. MELLÉKLETHEZ

**Az anyagok azonosítására, osztályozására és címkézésére vonatkozó megjegyzések magyarázata**

DA:

Q. *megjegyzés:*

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:

Q. *megjegyzés:*

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.

(Nem vonatkozik az ES változatra.)

(Nem vonatkozik a DE változatra.)

(Nem vonatkozik az EL változatra.)

(Nem vonatkozik az EN változatra.)

(Nem vonatkozik az FR változatra.)

(Nem vonatkozik az IT változatra.)

(Nem vonatkozik az NL változatra.)

(Nem vonatkozik a PT változatra.)

(Nem vonatkozik az FI változatra.)

*1. B. MELLÉKLET*

**A. TÁBLÁZAT**

| Z | Szimbólum | 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” |

1. C. MELLÉKLET

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 006-011-00-7 | Karbaril (ISO)<br>1 Naftil-metil-karbamát | | 200-555-0 | 63-25-2 | Karc.kat. 3; R40<br>Xn; R22<br>N; R50 | Xn; N<br>R: 22-40-50<br>S: (2-)22-24-36/37-46-61 | | |
| 006-013-00-8 | Metám-nátrium (ISO)<br>Nátrium metil-ditiokarbamát | | 205-293-0 | 137-42-8 | Xn; R22<br>R31<br>C; R34<br>R43<br>N; R50-53 | C; N<br>R: 22-31-34-43-50/53<br>S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 006-015-00-9 | Diuron (ISO)<br>N-(N, 4-diklórfenil)-N,N-dimetilkarbamid | | 206-354-4 | 330-54-1 | Karc. Kat. 3; R40<br>Mut. Kat. 3; R40<br>Xn< R22-48/22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-40-48/22-50/53<br>S: (2-)13-22-23-37-46-60-61 | | |
| 006-016-00-4 | Propoxur (ISO)<br>2-izopropoxifenil N-metil-karbamát2-izopropoxifenil metil-karbamát | | 204-043-8 | 114-26-1 | T; R25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-50/53<br>S: (1/2-)37-45-60-61 | | |
| 006-017-00-X | Aldicarb (ISO)<br>2-metil-2-(metiltio)propanol-O-(N-metilkarbamoil)oxim | | 204-123-2 | 116-06-3 | T+; R26/28<br>T; R24<br>N; R50-53 | T+; N<br>R: 24-26/28-50/53<br>S: (1/2-)22-36/37-45-60-61 | | |
| 006-018-00-5 | Aminocarb (ISO)<br>4-Dimetil-amino-3-tolil-metil-karbamát | | 217-990-7 | 2032-59-9 | T; R24/25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 24/25-50/53<br>S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |
| 006-019-00-0 | Diallát (ISO)<br>S-(2,3-diklórallil)-N,N-diizopropil-tiokarbamát | | 218-961-1 | 2303-16-4 | Karc. Kat. 3; R40<br>Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-40-50/53<br>S: (2-)25-36/37-60-61 | | |
| 006-020-00-6 | Barban (ISO)<br>4-klórbutil-2-inil-N-(3-klórfenil)karbamát | | 202-930-4 | 101-27-9 | Xn; R22<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-43-50/53<br>S: (2-)24-36/37-60-61 | | |
| 006-023-00-2 | mercaptodimethur (ISO)<br>metiocarb<br>3,5-dimetil-4-metil-tiofenil N-metil-karbamát | | 217-991-2 | 2032-65-7 | T; R25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-50/53<br>S: (1/2-)22-37-45-60-61 | | |
| 006-024-00-8 | Proxán-nátrium (ISO)<br>Nátrium-O-izopropil-ditiokarbonát | | 205-443-5 | 140-93-2 | Xn; R22<br>Xi; R38<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-38-51/53<br>S: (2-)13-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 006-026-00-9 | Karbofurán (ISO)<br>2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurán-7-il N-metil-karbamát | | 216-353-0 | 1563-66-2 | T+; R26/28<br>N; R50-53 | T+; N<br>R: 26/28-50/53<br>S: (1/2-)36/37-45-60-61 | | |
| 006-028-00-X | Dinobuton (ISO)<br>2-(1-Metil-propil)-4,6-dinitro-fenil-izopropil-karbonát | | 213-546-1 | 973-21-7 | T; R25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-50/53<br>S: (1/2-)37-45-60-61 | | |
| 006-029-00-5 | Dioxakarb (ISO)<br>2-(1,3-dioxolán-2-il)fenil-N-metil-karbamát | | 230-253-4 | 6988-21-2 | T; R25<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 25-51/53<br>S: (1/2-)37-45-61 | | |
| 006-033-00-7 | Metoxuron (ISO)<br>N'-(3-Klór-4-metoxifenil)-N,N-dimetilkarbamid | | 243-433-2 | 19937-59-8 | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60/61 | | |
| 006-034-00-2 | Pebulát (ISO)<br>N-Butil-N-etil-S-propil-tiokarbamát | | 214-215-4 | 1114-71-2 | Xn; R22<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-51/53<br>S: (2-)23-61 | | |
| 006-035-00-8 | Pirimikarb (ISO)<br>5,6-Dimetil-2-dimetilaminopirimidin-4-il-N,N-dimetil-karbamát | | 245-430-1 | 23103-98-2 | T; R25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-50/53<br>S: (1/2-)22-37-45-60-61 | | |
| 006-037-00-9 | Promekarb (ISO)<br>3-izopropil-5-metilfenil N-metil-karbamát | | 220-113-0 | 2631-37-0 | T; R25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-50/53<br>S: (1/2-)24-37-45-60-61 | | |
| 006-038-00-4 | Szulfallát (ISO)<br>2-klórallil -dietil-ditiokarbamát | E | 202-388-9 | 95-06-7 | Karc. Kat. 2; R45<br>Xn; R22<br>N; R50-/53 | T; N<br>R: 45-22-50/53<br>S: 53-45-60-61 | | |
| 006-039-00-X | Triallát (ISO)<br>S-(2,3,3-triklórallil)- diizopropil-tiokarbamát | | 218-962-7 | 2303-17-5 | Xn; R22-48/22<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-43-48/22-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 006-042-00-6 | Monurom (ISO)<br>N'-(4-Klórfenil)-N,N-dimetilkarbamid | | 205-766-1 | 150-68-5 | Karc. Kat. 3; R40<br>Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-40-50/53<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |
| 006-043-00-1 | Monuron-TCA<br>N'-(4-Klórfenil)-N,N-dimetilkarbamid-triklór-acetát | | – | 140-41-0 | Xi; R36/38<br>Karc. Kat. 3; R40<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 36/38-40-50/53<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 006-045-00-2 | Methomyl (ISO)<br>1-(metiltio)etilidén-amino N-metil-karbamát | | 240-815-0 | 16752-77-5 | T+; R28<br>N: R50-53 | T+; N<br>R: 28-50/53<br>S: (1/2-)22-36/37-45-60-61 | | |
| 006-046-00-8 | Bendiokarb (ISO)<br>2,2-Dimetil-1,3-benzodioxol-4-il-N-metil-karbamát | | 245-216-8 | 22781-23-3 | T; R23/25<br>Xn; R21<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 21-23/25-50/53<br>S: (1/2-)22-36/37-45-60-61 | | |
| 006-047-00-3 | Bufenkarb (ISO)<br>3-(1-Metilbutil)fenil-N-metil-karbamát és 3-(1-Etilpropil)fenil-N-metil-karbamát keveréke | | – | 8065-36-9 | T; R24/25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 24/25-50/53<br>S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |
| 006-048-00-9 | Ethiofenkarb (ISO)<br>2-(Etil-tiometil)fenil-N-metil-karbamát | | 249-981-9 | 29973-13-5 | Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-50/53<br>S: (2-)60-61 | | |
| 006-050-00-X | Fenuron-TCA<br>1,1-Dimetil-3-fenilkarbamid-triklór-acetát | | – | 4482-55-7 | Xi; R38<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 38-50/53<br>S: (2-)60-61 | | |
| 006-053-00-6 | Isoprokarb (ISO)<br>2-izopropilfenil-N-metil-karbamát | | 220-114-6 | 2631-40-5 | Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-50/53<br>S: (2-)60-61 | | |
| 006-054-00-1 | Mexakarb (ISO)<br>3,5-Dimetil-4-dimetil-amino-fenil-N-metil-karbamát | | 206-249-3 | 315-18-4 | T+; R28<br>Xn; R21<br>N; R50-53 | T+; N<br>R: 21-28-50/53<br>S: (1/2-)36/37-45-60-61 | | |
| 006-057-00-8 | Nitrapirin (ISO)<br>2-Klór-6-(triklór-metil)piridin | | 217-682-2 | 1929-82-4 | Xn; R22<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-51/53<br>S: (2-)24-61 | | |
| 006-060-00-4 | Oxicarboxin (ISO)<br>2,3-Dihidro-6-metil-5-(N-fenilkarbamoil)- 1-4-oxotiin 4,4-dioxid | | 226-066-2 | 5259-88-1 | Xn; R22<br>R52-53 | Xn;<br>R: 22-52/53<br>S: (2-)61 | | |
| 006-069-00-3 | Tiofanát-metil (ISO)<br>1,2-Di(3-metoxikarbonil-2-tioureido)benzol | | 245-740-7 | 23564-05-8 | Muta. Kat, 3; R40<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 40-50/53<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |
| 006-070-00-9 | Furmeciklox<br>N-Ciklohexil-N-metoxi-2,5-dimetil-3-furamid | | 262-302-0 | 60568-05-0 | Karc. Kat. 3; R40<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 40-50/53<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 006-088-00-7 | Benfurakarb (ISO)<br>Etil-N-[2,3-dihidro-2,2-dimetil-benzofurán-7-il-oxi-karbonil(metil)aminotio]-N-izopropil-ß-alalinát | | – | 82560-54-1 | T; R23/25<br>N; 50-53 | T; N<br>R: 23/25-50/53<br>S: (1/2-)36/37-45-60-61 | | |
| 007-012-00-5 | N,N-Dimetil-hidrazin<br>1,1-Dimetil-hidrazin | E | 200-316-0 | 57-14-7 | F; R11<br>Karc. Kat. 2; R45<br>T; R23/25<br>C; R34<br>N; R51-53 | F; T; N<br>R: 45-11-23/25-34-51/53<br>S: 53-45-61 | | |
| 007-013-00-0 | N,N-Dimetil-hidrazin<br>1,2-Dimetil-hidrazin | E | – | 540-73-8 | Karc. Kat. 2; R45<br>T; R23/24/25<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 45-23/24/25-51/53<br>S: 53-45-61 | C ≥ 25 %: T; R45-23/24/25<br>3 % ≤ C < 25 %: T; R45-20/21/22<br>0,01 % ≤ C < 3 %: T; R45 | |
| 009-003-00-1 | Hidrogén-fluorid… % | B | 231-634-8 | 7664-39-3 | T+; R26/27/28<br>C; R35 | T+;C<br>R: 26/27/28-35<br>S: (1/2-)7/9-26-36/37-45 | C ≥ 7 %: T+; C;R26/27/28-35<br>1 % ≤ C < 7 %: T; R23/24/25-34<br>0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-36/37/38 | |
| 015-039-00-9 | Azinfos-metil (ISO)<br>O, O-Dimetil-S-(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il-metil)-ditiofoszfát | | 201-676-1 | 86-50-0 | T+; R26/28<br>T; R24<br>R43<br>N; R50-53 | T+; N<br>R: 24-26/28-43-50/53<br>S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |
| 015-048-00-8 | Fention (ISO)<br>O, O-dimetil-O-(4-metiltio-m-tolil)tiofoszfát | | 200-231-9 | 55-38-9 | Muta. Kat. 3; R40<br>T; R23-48/25<br>Xn; R21/22<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 21/22-23-40-48/25-50/53<br>S: (1/2-)36/37-45-60-61 | | |
| 015-056-00-1 | Azinfos-etil (ISO)<br>O, O-Dietil-S-(4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3(4H)-il-metil)-ditiofoszfát | | 220-147-6 | 2642-71-9 | T+; R28<br>T: R24<br>N; R50-53 | T+; N<br>R: 24-28-50/53<br>S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |
| 015-140-00-8 | Triazofos (ISO)<br>O, O-Dietil-O-(1-fenil-1H-1,2,4-triazol-3-il)-tiofoszfát | | 245-986-5 | 24107-47-8 | T; R23/25<br>Xn; R21<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 21-23/25-50/53<br>S: (1/2-)36/37-45-60-61 | | |
| 016-013-00-X | Kén-diklorid | | 234-129-0 | 10545-99-0 | R14<br>C: R34<br>N: R50 | C; N<br>R: 14-34-50<br>S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | C ≥ 10 %: C; R34<br>5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38 | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 016-014-00-5 | Kén-tetraklorid | | – | 13451-08-6 | R14<br>C; R34<br>N; R50 | C; N<br>R: 14-34-50<br>S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | C ≥ 10 %: C; R34<br>5 % ≤ C < 10 %:<br>Xi; R36/37/38 | |
| 016-023-00-4 | Dimetil-szulfát | E | 201-058-1 | 77-78-1 | Karc. Kat. 2; R45<br>Muta. Kat. 3; R40<br>T+; R26<br>T; R25<br>C; R24<br>R43 | T+<br>R: 45-25-26-34-43<br>S: 53-45 | C ≥ 25 %: T+; R45-25-26-34-43<br>10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-22-26-34-43<br>7 % ≤ C < 10 % : T+; R45-22-26-36/37/38-43<br>5 % ≤ C < 7 %: T; R45-22-23-36/37/38-43<br>3 % ≤ C < 5 %: T; R45-22-23-43<br>1 % ≤ C < 3 %: T; R45-23-43<br>0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20<br>0,01 % ≤ C < 0,1 %: T;R45 | |
| 016-024-00-X | Dimexano (ISO)<br>Bisz(metoxi-tiokarbonil)-diszulfid | | 215-993-8 | 1468-37-7 | Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-50/53<br>S: (2-)60-61 | | |
| 016-071-00-6 | Trinátrium-3-amino-6,13-diklór-10-[[3-[[4-klór-6-(szulfofenilamino)- - 1,3,5-triazin-2-il] -amino]propil]amino]- 4,11-trifenoxidioxazin-diszulfonát | | 410-130-3 | 136248-03-8 | R43 | Xi<br>R: 43<br>S: (2-)22-24-37 | | |
| 022-001-00-5 | Titán-tetraklorid | | 231-441-9 | 7550-45-0 | R14<br>C; R34 | C<br>R: 14-34<br>S: (1/2-)7/8-26-36/37/39-45 | C ≥ 10 %: C; R34<br>5 % ≤ C < 10 %:<br>Xi;R36/37/38 | |
| 030-004-00-8 | Dimetil-cink [1]<br>Dietil-cink [2] | | 208-884-1 [1]<br>209-161-3 [2] | 544-97-8 [1]<br>557-20-0 [2] | R14<br>F; R17<br>C; R34<br>N; R50-53 | F; C; N<br>R: 14-17-34-50/53<br>S: (1/2-)16-43-45-60-61 | | |
| 050-002-00-0 | Cihexatin (ISO)<br>hidroxi-triciklo-hexilon-hidrid<br>Triciklohexil-hidroxi-ón | | 236-049-1 | 13121-70-5 | Xn; R20/21/22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 20/21/22-50/53<br>S: (2-)13-60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 050-012-00-5 | Tetraciklohexil-ón [1]<br>Klór-triciklohexil-ón [2]<br>Butil-triciklohexil-ón [3] | | 215-910-5 [1]<br>221-437-5 [2]<br>230-358-5 [3] | 1449-55-4 [1]<br>3091-32-5 [2]<br>7067-44-9 [3] | Xn; R20/21/22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 20/21/22-50/53<br>S: (2-)26-28-60-61 | C ≥ 1 %: Xn; R20/21/22 | 1 |
| 050-017-00-2 | fenbutatin oxide (ISO)<br>bisz(trisz(2-metil-2-fenil-propil)ón)oxid | | 236-407-7 | 13356-08-6 | T+; R26<br>Xi; R36/38<br>N; R50/53 | T+; N<br>R: 26-36/38-50/53<br>S: (1/2-)28-36/37-45-60-61 | | |
| 082-009-00-X | ólom-szulfokromát, sárga<br>C. I. Pigment Yellow 34 [ezt az anyagot C. I.77603-as szín index szerkezet számmal azonosították a szín indexben] | | 215-693-7 | 1344-37-2 | Karc. Kat. 3; R40<br>Repr. Kat. 1; R61<br>Repr. Kat. 3; R62<br>R33<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 61-33-40-50/53-62<br>S: 53-45-60-61 | | 1 |
| 082-010-00-5 | ólom kromát molibdát szulfát vörös<br>C. I. Pigment red 104 [ezt az anyagot C. I. 77605-ös szín index szerkezet számmal azonosították a szín indexben] | | 235-759-9 | 12656-85-8 | Karc. Kat. 3; R40<br>Repr. Kat. 1; R61<br>Repr. Kat. 3; R62<br>R33<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 61-33-40-50/53-62<br>S: 53-45-60-61 | | 1 |
| 601-024-00-X | Kumol [1]<br>Propilbenzol [2] | | 202-704-5 [1]<br>203-132-9 [2] | 98-82-8 [1]<br>103-65-1 [2] | R10<br>Xn; R65<br>Xi; R37<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 10-37-51/53-65<br>S: (2-)24-37-61-62 | | 4 |
| 601-032-00-3 | Benzo[a]pirén<br>Benzo[def]krizén | | 200-028-5 | 50-32-8 | Karc. Kat. 2; R45<br>Muta. Kat. 2; R46<br>Repr. Kat. 2;R60-61<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 45-46-60-61-50/53<br>S: 53-45-60-61 | | |
| 601-034-00-4 | Benzo[e]acefenantrilén | | 205-911-9 | 205-99-2 | Karc. Kat. 2; R45<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 45-50/53<br>S: 53-45-60-61 | | |
| 602-035-00-2 | 1,4-Diklór-benzol<br>p-Diklór-benzol | | 203-400-5 | 106-46-7 | Xi; R36<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 36-50/53<br>S: (2-)24/25-46-60-61 | | |
| 602-054-00-6 | 3-Jódprop-1-én<br>Allil-jodid | | 209-130-4 | 556-56-9 | R10<br>C; R34 | C<br>R: 10-34<br>S: (1/2-)7-26-45 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 603-076-00-9 | But-2-in-1,4-diol<br>2-Butin-1,4-diol | | 203-788-6 | 110-65-6 | T: R23/25<br>Xn; R21-48/22<br>C; R34 | T<br>R: 21-23/25-34-48/22<br>S: (1/2-)26-36/37/39-45 | C ≥ 50 %: T; R21-23/25-34-48/22<br>25 % ≤ C < 50 %: T; R21-23/25-36/38-48/22<br>10 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/22-48/22<br>3 % ≤ C < 10 %: Xn; R20/22 | |
| 603-091-00-0 | exo-1-Metil-4-(1-metiletil)-7-oxabiciklo[2.2.1]heptán-2-ol | | 402-470-6 | 87172-89-2 | O; R8<br>Xn; R22<br>Xi; R36 | O; Xn<br>R: 8-22-36<br>S: (2-)26 | | |
| 603-093-00-1 | Exo-(+/-Metil-2-(2-meilbenziloxi)-4-izopropil-7-1-oxabiciklo[2.2.1]heptán | | 402-410-9 | 87818-31-3 | Xn; R20<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 20-51/53<br>S: (2-)23-61 | | |
| 603-097-00-3 | 1,1',1''-Nitrilotripropán-2-ol,<br>1,1',1''-Nitrilotrisz(propán-2-ol) | | 204-528-4 | 122-20-3 | Xi; R36<br>R52-53 | Xi<br>R: 36-52/53<br>S: (2-)26-61 | | |
| 603-117-00-0 | Propán-2-ol<br>Izopropil-alkohol<br>Izopropanol | | 200-661-7 | 67-63-0 | F; R11<br>Xi; R36<br>R67 | F; Xi<br>R: 11-36-67<br>S: (2-)7-16-24/25-26 | | 6 |
| 604-020-00-6 | Bifenil-2-ol<br>2-Hidroxi-bifenil<br>2-Fenil-fenol (ISO) | | 201-993-5 | 90-43-7 | Xi; R36/37/38<br>N; R50 | Xi; N<br>R: 36/37/38-50<br>S: (2-)22-61 | | |
| 604-021-00-1 | 2-Fenilfenol-nátriumsó<br>Nátrium-2-difenilát | | 205-055-6 | 132-27-4 | Xn; R22<br>Xi; R37/38-41<br>N; R50 | Xn; N<br>R: 37/38-41-50<br>S: (2-)22-26-61 | | |
| 604-024-00-8 | 4,4'-Izobutil-etilidén-difenol<br>(alt.): 2,2-bisz(4'hidroxifenil)-4-metil-pentán | | 401-720-1 | 6807-17-6 | Repr. Kat. 2; R60<br>Xi; R36<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 60-36-50/53<br>S: 53-45-60-61 | | |
| 604-041-00-0 | acifluorfen [1]<br>acifluorfen-nátrium [2]<br>5-[2-Klór-4-(trifluor-metil)fenoxi]-2-nitrobenzoesav [1]<br>nátrium-5-[2-klór-4-(trifluormetil)fenoxi]-2-nitrobenzoát [2] | | 256-634-5 [1]<br>263-560-7 [2] | 50594-66-6 [1]<br>62476-59-9 [2] | Xn; R22<br>Xi; R38-41<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-38-41-50/53<br>S: (2-)24-39-60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 604-043-00-1 | Monobenzon<br>4-Hidroxi-fenil-benzil éter<br>Hidrokinon-monobenzil-éter | | 203-083-3 | 103-16-2 | Xi; R36<br>R43 | Xi<br>R: 36-43<br>S: (2-)24/25-26-37 | | |
| 604-044-00-7 | mekvinol<br>4-Metoxi-fenol<br>Hidrokinon-monometil-éter | | 205-769-8 | 150-76-5 | Xn; R22<br>Xi; R36<br>R43 | Xn<br>R: 22-36-43<br>S: (2-)24/25-26-377/39-46 | | |
| 605-016-00-7 | Glioxál… %<br>Etándial… % | B | 203-474-9 | 107-22-2 | Muta. Kat. 3; R40<br>Xn; R20<br>Xi; R36/38<br>R43 | Xn<br>R: 20-36/38-40-43<br>S: (2-)36/37 | C ≥ 10 %: Xn; R20-36/38-40-43<br>1 % ≤ C < 10 %: Xn; R40-43 | |
| 606-016-00-X | Pindon (ISO)<br>2-Pivaloilindán-1,3-dion | | 201-462-8 | 83-26-1 | T; R25-48/25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-48/25-50/53<br>S: (1/2-)37-45-60-61 | | |
| 606-018-00-0 | Diklon (ISO)<br>2,3-Diklórnaftalin-1,4-dion | | 204-210-5 | 117-80-6 | Xn; R22<br>Xi; R36/38<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-36/38-50/53<br>S: (2-)26-60-61 | | |
| 606-019-00-6 | Klórdekon (ISO)<br>Perklórpentaciklo[5,3,0,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{4,8}$] dekán-5-on<br>dekaklór-penta-ciklo[5,2,1,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{5,8}$] dekan-4<br>-on | | 205-601-3 | 143-50-0 | Karc. Kat. 3; R40<br>T; R24/25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 24/25-40-50/53<br>S: (1/2-)22-36/37-45-60-61 | | |
| 606-034-00-8 | Metribuzin (ISO)<br>4-Amino-6-*tercier*-butil-3-metiltio-1,2,4-triazin-5(4H)-on<br>4-amino-4,5-dihidro-6-(1,1-dimetiletil)-3-metiltio-1,2,4-triazin-5(H)-on | | 244-209-7 | 21087-64-9 | Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-50/53<br>S: (2-)60-61 | | |
| 606-035-00-3 | Kloridazon (ISO)<br>5-Amino-4-klór-2-fenil-piridazin-3(2H)-on<br>pirazon | | 216-920-2 | 1698-60-8 | R43<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 43-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 606-036-00-9 | kinometionát<br>chinomethionat (ISO)<br>6-Metil-1,3-ditiolo(4,5-b)kinoxalin-2-on | | 219-455-3 | 2439-01-2 | Repr. Kat. 3; R62<br>Xn; R20/21/22-48/22<br>Xi; R36<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 20/21/22-36-43-48/22-50/53-62<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 606-037-00-4 | Triadimefon (ISO)<br>1-(4-Klórfenoxi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)butanon | | 256-103-8 | 43121-43-3 | Xn; R22<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-51/53<br>S: (2-)61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 606-044-00-2 | 2,4,6-Trimetilbenzofenon | | 403-150-9 | 954-16-5 | Xn; R22<br>Xi; R36<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-36-50/53<br>S: (2-)26-60-61 | | |
| 607-043-00-X | Fikamba (ISO)<br>2,5-Diklór-6-metoxibenzoesav<br>3,6-Diklór-2-metoxibenzoesav | | 217-635-6 | 1918-00-9 | Xn; R22<br>Xi; R41<br>R52-53 | Xn; N<br>R: 22-41-52/53<br>S: (2-)26-61 | | |
| 607-057-00-6 | Kumaklór (ISO)<br>3-[1-(4-Klór-fenil)-3-oxibutil)-4-hidroxi-kumarin | | 201-378-1 | 81-82-3 | Xn; R48/22<br>R52-53 | Xn<br>R: 48/22-52/53<br>S: (2-)37-61 | | |
| 607-058-00-1 | Kumafuril (ISO)<br>fumarin<br>(RS)-3-[1-(2-Furil)-3-oxibutil]-4-hidroxi-kumarin<br>4-hidroxi-3-[3-oxo-1-(2-furil)butil]kumarin | | 204-195-5 | 117-52-2 | T; R25-48/25<br>R52-53 | T<br>R: 25-48/25-52/53<br>S: (1/2-)37-45-61 | | |
| 607-079-00-6 | Kelevan (ISO)<br>Etil-5-(perklór-5-hidroxi-pentaciklo (5,3,0,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{4,8}$)dekán-5-il)-4-oxopentanoát<br>etil-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10-dekaklór-4-hidroxipentaciklo(5,2,1,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{5,8}$)dec-4-il)-4-oxovalerát | | – | 4234-79-1 | T; R24<br>Xn R22<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 22-24-51/53<br>S: (1/2-)36/37-45-61 | | |
| 607-097-00-4 | Benzol-1,2,4-trikarbonsav-1,2-anhidrid<br>Trimellitsav-anhidrid | | 209-008-0 | 552-30-7 | Xi; R37-41<br>R42/43 | Xn<br>R: 37-41-42/43<br>S: (2-)22-26-36/37/39 | | |
| 607-143-00-3 | Valerián sav | | 203-677-2 | 109-52-4 | C; R34<br>R52-53 | C<br>R: 34-52/53<br>S: (1/2-)26-36-45-61 | | |
| 607-152-00-2 | 2,3,6-TBA (ISO)<br>2,3,6-Triklórbenzoesav | | 200-026-4 | 50-31-7 | Xn; R22<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-51/53<br>S: (2-)61 | | |
| 607-153-00-8 | Benazolin (ISO)<br>4-Klór-2,3-dihidro-2-oxo-1,3-benzotiazol-3-il-ecetsav | | 223-297-0 | 3813-05-6 | Xi; R36/38<br>R52-53 | Xi<br>R: 36/38-52/53<br>S: (2-)22-61 | | |
| 607-156-00-4 | Klórfenson (ISO)<br>4-Klór-fenil-4-klór-benzol-szulfonát | | 201-270-4 | 80-33-1 | Xn; R22<br>Xi; R38<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-38-50/53<br>S: (2-)37-60-61 | | |
| 607-158-00-5 | Klórecetsav-nátrium-só<br>Nátrium-monoklóracetát | | 223-498-3 | 3926-62-3 | T; R25<br>Xi; R38<br>N; R50 | T; N<br>R: 25-38-50<br>S: (1/2-)22-37-45-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 607-159-00-0 | Klórobenzilat (ISO)<br>Etil-2,2-di(4-klórfenil)-2-hidroxi-acetát<br>Etil-4,4'-diklórbenzilát | | 208-110-2 | 510-15-6 | Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-50/53<br>S: (2-)60-61 | | |
| 607-176-00-3 | a-3-[3-Benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-(2H-hidroxi-fenil]-propionil-omega-hidroxipoli(oxi-etilén) és a-3-[3-(2H-Benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxi-fenil]-propionil-omega-3-[3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-terc-butil-4-hidroxi-fenil]-propion-iloxi-poli(oxi-etilén) keveréke | | 400-830-7 | – | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)36/37-61 | | |
| 607-188-00-9 | Nátrium-hidrogénN-karboxilátetil-N-oktadec-9-en-il-maleamát | | 402-970-4 | – | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)24/37-61 | | |
| 607-209-00-1 | 0,0'-Diizopropil(tritio)-ditioformát; O, O'-Diizopropil(tetratio)-ditioformát és O, O'-Diizopropil(pentatio)-ditioformát keveréke | | 403-030-6 | – | Xn; R22<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-43-50/53<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |
| 607-213-00-3 | Etil-3,3-bisz(terc-pentilperoxi)butirátEtil | | 403-320-2 | 67567-23-1 | E; R2<br>O; R7<br>R10<br>N; R51-53 | E; N<br>R: 2-7-10-51/53<br>S: (2-)3/7-14-33-36/37/39-61 | | |
| 607-217-00-5 | 2-Etoxi-etil-2-[4-(2,6-dihidro-2,6-dioxi-7-fenil-1,5-dioxaindacén-3-il)fenoxi]acetát | | 403-960-2 | – | R43<br>R53 | Xi<br>R: 43-53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 607-243-00-7 | nátrium 3,6-diklór-o-anizát [1]<br>3,6-Diklór-*o*-ánizs sav, vegyület, és 2,2'-iminodietanol (1:1) [2]<br>3,6-Diklór-*o*-ánizs sav, vegyület, és2-aminoetanol(1:1) [3] | | 217-846-3 [1]<br>246-590-5 [2]<br>258-527-9 [3] | 1982-69-0 [1]<br>25059-78-3 [2]<br>53404-28-7 [3] | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 607-248-00-4 | Naftalam-nátrium<br>nátrium N-naft-1-il-ftalamát | | 205-073-4 | 132-67-2 | Xn; R22 | Xn<br>R: 22<br>S: (2) | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 607-249-00-X | (1-Metil-1,2-etándiil)bisz[oxi(metil-2,1-etándiil)diakrilát<br>Tripropilén glikol diakrilát<br>TPGDA | | 256-032-2 | 42978-66-5 | Xi; R36/37/38<br>R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 36/37/38-43-51/53<br>S: (2-)24-37-61 | C ≥ 10 %;<br>Xi; R36/37/38-43<br>1 % ≤ C < 10 %: Xi; R43 | |
| 607-252-00-6 | Lambda-Cihalotrin (ISO)<br>(S)-a-Ciano-3-fenoxibenzil-(Z)-(1R)-cisz-3-(2-klór-3,3,3-trifluor-propenil)- 2,2-dimetil-ciklopropán-karboxilát és (R)-a-Ciano-3-fenoxi-benzil-(Z)-(1S)-cisz-3-(2-klór-3,3,3-trifluor-propenil)-2,2-dimetil-ciklopropán-karboxilát 1:1 | | 415-130-7 | 91465-08-6 | T+; R26<br>T: R25<br>Xn; R21<br>N; R50-53 | T+; N<br>R: 21-25-26-50/53<br>S: (1/2-)<br>28-36/37/39-38-45-60-61 | | |
| 607-255-00-2 | fluroxypyr (ISO)<br>4-amino-3,5-diklór-6-fluor-2-piridiloxi ecetsav | | – | 69377-81-7 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 608-003-00-4 | Akrilnitril | D<br>E | 203-466-5 | 107-13-1 | F; R11<br>Karc. Kat. 2; R45<br>T; R23/24/25<br>Xi< R37/38-41<br>R43<br>N; R51-53 | F; T; N<br>R: 45-11-23-/24/25-37/38-41-43-51/53<br>S: 9-16-53-45-61 | C ≥ 20 %: T; R45-23/24/25-37/38-41-43<br>10 % ≤ C < 20 %: T; R45-23/24/25-41-43<br>5 % ≤ C < 10 %: T; R45-23/24/25-36-43<br>1 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25-43<br>0,2 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22<br>0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45 | |
| 608-016-00-5 | 1,4-Dicián-2,3,5,6-tetra-klór-benzol<br>Tetraklórtereftalonitril | | 401-550-8 | 1897-41-2 | R43<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 43-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 609-030-00-4 | Dinoterb (ISO)<br>2-terc-Butil-4,6-dinitro-fenol | E | 215-813-8 | 1420-07-1 | Repr. Kat. 2; R61<br>T+; R28<br>T; R24<br>R44<br>N; R50-53 | T+; N<br>R: 61-24-28-44-50/53<br>S: 53-45-60-61 | | |
| 609-040-00-9 | Nitrofen (ISO)<br>2,4-Diklórfenil-4-nitrofenil-éter | E | 217-406-0 | 1836-75-5 | Karc. Kat. 2; R45<br>Repr. Kat. 2; R61<br>Xn; R22<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 45-61-22-50/53<br>S: 53-45-60-61 | | |
| 609-044-00-0 | Teknazen (ISO)<br>1,2,4,5-Tetraklór-3-nitrobenzol | | 204-178-2 | 117-18-0 | Xn; R22<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-43-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 611-008-00-4 | 4-Amino-azo-benzol<br>4-Fenil-azo-anilin | | 200-453-6 | 60-09-3 | Karc. Kat. 2; R45<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 45-50/53<br>S: 53-45-60-61 | | |
| 611-013-00-1 | trilitium 1-hidroxi-7-(3-szulfonáto-anilino)-2-(3-metil-4-(2-metoxi-4-(3-szulfonáto-fenilazo)fenilazo)fenilazo)naftalin-3-szulfonát | | 403-650-7 | 117409-78-6 | E; R2<br>N; R51-53 | E; N<br>R: 2-51/53<br>S: (2-)35-61 | | |
| 611-031-00-X | 4,4'-(4-Imonociklohexa-2,5-dienilidén-metilén)dianilin-hidroklorid<br>C. I. Basic Red 9 | | 209-321-2 | 569-61-9 | Karc. Kat. 2; R45 | T<br>R: 45<br>S: 53-45 | | |
| 612-035-00-4 | 2-Metoxianilin<br>*o*-Anizidin | E | 201-963-1 | 90-04-0 | Karc. Kat. 2; R45<br>Muta. Kat. 3; R40<br>T; R23/24/25 | T<br>R: 45-23/24/25<br>S: 53-45 | | |
| 612-042-00-2 | Benzidin<br>1,1'-Bifenil-4,4'-diamin<br>4,4'-Diamino-bifenil<br>Bifenil-4,4'-iléndiamin | E | 202-199-1 | 92-87-5 | Karc. Kat. 1; R45<br>Xn; R22<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 45-22-50/53<br>S: 53-45-60-61 | C ≥ 25 %: T; R45-22<br>0,01 % ≤ C < 25 %: T; R45 | |
| 612-051-00-1 | 4,4'-Diaminodifenilmetán<br>4,4'-Metiléndianilin | E | 202-974-4 | 101-77-9 | Karc. Kat. 2; R45<br>Muta. Kat. 3; R40<br>T;R39/23/24/25 Xn; R48/20/21/22<br>R43<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 45-39/23/24/25-43-48/20/21/22-51/53<br>S: 53-45-61 | | |
| 612-081-00-5 | 4,4'-di-*o*-toluidin sói<br>3,3'-dimetil-benzidin sói<br>*o*-tolidin sói | A<br>E | 210-322-5<br>265-294-7<br>277-985-0 | 612-82-8<br>64969-36-4<br>74753-18-7 | Karc. Kat. 2; R45<br>Xn; R22<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 45-22-51/53<br>S: 53-45-61 | | |
| 612-099-00-3 | 4-metil-m-fenilén-diamin<br>2,4-Diaminotoluol | E | 202-453-1 | 95-80-7 | Karc. Kat. 2; R45<br>T; R25<br>Xn; R21<br>Xi; R36<br>R43<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 45-21-25-36-43-51/53<br>S: 53-45-61 | | |
| 612-105-00-4 | 2-Piperazin-1-iletil-amin | | 205-411-0 | 140-31-8 | Xn; R21/22<br>C; R34<br>R43<br>R52-53 | C<br>R: 21/22-34-43-52/53<br>S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 612-111-00-7 | 2-Metil-m-fenilén-diamin<br>2,6-Toluoldiamin | | 212-513-9 | 823-40-5 | Muta. Kat. 3; R40<br>Xn; R21/22<br>R43<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 21/22-40-43-51/53<br>S: (2-)24-36/37-61 | | |
| 612-125-00-3 | 2-Metil-p-fenilén-diamin<br>Toluol-2,5-diamin | | 202-442-1 | 95-70-5 | T; R25<br>Xn; R20/21<br>R43<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 20/21-25-43-51/53<br>S: (1/2-)24-37-45-61 | | |
| 612-144-00-7 | Flumetralin (ISO)<br>N-(2-Klór-6-fluor-benzil)-N-etil-α, α, α-trifluor-2,6-dinitro-p-toluidin | | – | 62924-70-3 | Xi; R36/38<br>R43<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 36/38-43-50/53<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |
| 612-151-00-5 | Diamino-toluol | E | 246-910-3 | 25376-45-8 | Karc. Kat. 2; R45<br>T; R25<br>Xn; R20/21<br>Xi; R36<br>R43<br>N; R51-53 | T; N<br>R: 45-20/21-25-36-43-51/53<br>S: 53-45-61 | | |
| 613-018-00-4 | Morfamkvat (ISO)<br>1,1'-Bisz(3,5-dimetil-morfolino-karbonil-metil)- 4,4'-bipiridinium-ion | | – | 7411-47-4 | Xn; R22<br>Xi; R36/37/38<br>R52-53 | Xn<br>R: 22-36/37/38-52/53<br>S: (2-)22-36-61 | | |
| 613-031-00-5 | Szimklozén<br>Triklórizocianúrsav<br>triklór-1,3,5-triazinetrion | | 201-782-8 | 87-90-1 | O; R8<br>Xn; R22<br>R31<br>Xi; R36/37<br>N; R50-53 | O; Xn; N<br>R: 8-22-31-36/37-50/53<br>S: (2-)8-26-41-60-61 | | |
| 613-038-00-3 | 6-Fenil-1,3,5-triazin-2,4-diil-amin<br>6-Fenil-1,3,5-triazin-2,4 diamin<br>Benzo-guanamin | | 202-095-6 | 91-76-9 | Xn; R22<br>R52-53 | Xn<br>R: 22-52/53<br>S: (2-)61 | | |
| 613-042-00-5 | Imazalil (ISO)<br>1-[2-(Alliloxi)-2-(2,4-diklórfenil)etil]-1H-imidazol | | 252-615-0 | 35554-44-0 | Xn; R20/22<br>N; R41<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 20/22-41-50/53<br>S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 613-043-00-0 | Imazalil szulfát (ISO)<br>1-[2-(Allil-oxi)etil-2-(2,4-diklórfenil)]-1H-imidazólium-hidrogén-szulfát [1]<br>(±)-1-[2-(Allil-oxi)etil-2-(2,4-diklórfenil)]-1H-imidazólium-hidrogén-szulfát [2] | | 261-351-5 [1]<br>281-291-3 [2] | 58594-72-2 [1]<br>83918-57-4 [2] | Xn; R20/22<br>Xi; R41<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 20/22-41-50/53<br>S: (2-)26-39-60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 613-066-00-6 | Terbumeton (ISO)<br>2-*tercier*-butilamino-4-etilamino-6-metoxi-1,3,5-triazin | | 251-637-8 | 33693-04-8 | Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-50/53<br>S: (2-)60-61 | | |
| 613-091-00-2 | Morfamkvat-diklorid [1]<br>morfamkvát szulfát [2] | | 225-062-8 [1] | 4636-83-3 [1]<br>29873-36-7 [2] | Xn; R22<br>Xi; R36/37/38<br>R52-53 | Xn;<br>R: 22-36/37/38-52/53<br>S: (2-)22-36-61 | | |
| 613-098-00-0 | 1-Oktil-2-pirrolidon | | 403-700-8 | 2687-94-7 | C; R34<br>N; R51-53 | C; N<br>R: 34-51/53<br>S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-61 | | |
| 613-130-00-3 | Hexakonazol (ISO)<br>(RS)-2-(2,4-Diklórfenil)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)hexán-2-ol | | – | 79983-71-4 | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 613-131-00-9 | Pirrokilon (ISO)<br>1,2,5,6-Tetrahidropirrolo[3,2,1-ij]kinolin-4-on | | – | 57369-32-1 | Xn; R22<br>R52-53 | Xn<br>R: 22-52/53<br>S: (2-)61 | | |
| 613-134-00-5 | Miklobutanil (ISO)<br>2-(4-Klór-fenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)hexánnitril | | – | 88671-89-0 | Repr. Kat. 3; R63<br>Xn; R22<br>Xi; R36<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-36-51/53-63<br>S: (2-)36/37-46-61 | | |
| 613-137-00-1 | Metabenztiazuron (ISO)<br>1-(1,3-Benzotiazol-2-il) 1,3-dimetil-karbamid | | 242-505-0 | 18691-97-9 | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60-61 | | |
| 613-139-00-2 | Metszulfuron-metil<br>metil 2-(4-Metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il-karbomoil-szulfamoil) benzoesav | | – | 74223-64-6 | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60-61 | | |
| 614-001-00-4 | Nikotin (ISO)<br>(S)-3-(1-Metil-2-pirrolidinil)piridin | | 200-193-3 | 54-11-5 | T+; R27<br>T; R25<br>N; R51-53 | T+; N<br>R: 25-27-51/53<br>S: (1/2-)36/37-45-61 | | |
| 614-006-00-1 | Brucin<br>2,3-Dimetoxi-sztrichnidin-10-on | | 206-614-7 | 357-57-3 | T+; R26/28<br>R52-53 | T+<br>R: 26/28-52/53<br>S: (1/2-)13-45-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 614-007-00-7 | Brucin-szulfát [1]<br>Brucin-nitrát [2]<br>2,3-Dimetoxi-sztrichnidin-10-on-mono[(R)-1-metil-heptil-1,2-benzol-dikarboxilát sztrichnidin-10-on reakcióterméke 2,3-Dimetoxi-(S)mono[(R)-1-metil-heptil-1,2-benzol-dikarboxiláttal (1:1) | | 225-432-9 [1]<br>227-317-9 [2]<br>269-439-5 [3]<br>269-710-8 [4] | 4845-99-2 [1]<br>5786-97-0 [2]<br>68239-26-9 [3]<br>68310-42-9 [4] | T+; R26/28<br>R52-53 | T+<br>R: 26/28-52/53<br>S: (1/2-)13-45-61 | | |
| 615-006-00-4 | 2-Metil-*m*-fenilén diizocianát [1]<br>4-Metil-*m*-fenilén diizocianát [2]<br>*m*-Tolilidén diizocianát [3]<br>Toluol 2,6-di-izocianát [1]<br>Toluol 2,4-di-izocianát [2]<br>Toluol diizocianát [3] | C | 202-039-0 [1]<br>209-544-5 [2]<br>247-722-4 [3] | 91-08-7 [1]<br>584-84-9 [2]<br>26471-62-5 [3] | Karc. Kat. 3; R40<br>T+; R26<br>Xi; R36/37/38<br>R42/43<br>R52-53 | T+<br>R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53<br>S: (1/2-)23-36/37-45-61 | C ≥ 20 %: T+; R26-36/37/38-40-42/43<br>7 % ≤ C < 20 %: T+; R26-40-42/43<br>1 % ≤ C < 7 %: T; R23-40-42/43<br>0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20-42 | 2 |
| 616-010-00-9 | Tozilklóramid-nátrium | | 204-854-7 | 127-65-1 | Xn; R22<br>R31<br>C; R34<br>R42 | C<br>R: 22-31-34-42<br>S: (1/2-)7-22-26-36/37/39-45 | | |
| 616-034-00-X | Pirakarbolid (ISO)<br>3,4-Dihidro-6-metil-2H-pirán-5-karboxanilid | | 246-419-4 | 24691-76-6 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 616-035-00-5 | Cimoxanil<br>2-Ciano-N[(etilamino)karbonil]-2-(metoxiimino)acetamid | | 261-043-0 | 57966-95-7 | Xn; R22<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-43-50/53<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |
| 617-004-00-9 | 1,2,3,4-Tetrahidro-1-naftil-hidroperoxid | | 212-230-0 | 771-29-9 | O; R7<br>Xn; R22<br>C; R34<br>N; R50-53 | O; C; N<br>R: 7-22-34-50/53<br>S: (1/2-)3/7-14-26-36/37/39-45-60-61 | C ≥ 25 %: C; R22-34<br>10 % ≤ C < 25 %: C; R34<br>5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38 | |
| 617-006-00-X | Bisz(α, α-dimetilbenzil) peroxid | | 201-279-3 | 80-43-3 | O; R7<br>Xi; R36/38<br>N; R51-53 | O; Xi; N<br>R: 7-36/38-51/53<br>S: (2-)3/7-14-36/37/39-61 | | |
| 617-008-00-0 | Dibenzoil-peroxid<br>Benzoil-peroxid | | 202-327-6 | 94-36-0 | E; R2<br>Xi; R36<br>R43 | E; Xi;<br>R: 2-36-43<br>S: (2-)3/7-14-36/37/39 | | |
| 650-007-00-3 | Klórdimeform (ISO)<br>N'-(4-Klór-2-*o*-tolil)-N', N'-dimetil-formamidin | | 228-200-5 | 6164-98-3 | Karc. Kat. 3; R40<br>Xn; R21/22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 21/22-40-50/53<br>S: (2-)22-36/37-60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EU szám | CAS szám | Osztályozás | Címkézés | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 650-008-00-9 | drazoxolon (ISO)<br>4-(2-klórfenil-hidrazon)-3-metil-5-izoxazalon | | 227-197-8 | 5707-69-7 | T; R25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-50/53<br>S: (1/2-)<br>22-24-36/37-45-60-61 | | |
| 650-009-00-4 | Klórdimeform hidroklorid<br>*N'*-(4-klór-o-tolil)-*N,N*-dimetil-formamidin-monohidro-klorid<br>$N^2$-(4-klór-o-tolil)-$N^1$,$N^1$-dimetil-formamidin-hidroklorid | | 243-269-1 | 19750-95-9 | Karc. Kat. 3; R40<br>Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-40-50/53<br>S: (2-)22-36/37-60-61 | | |
| 650-033-00-5 | Eszfenvalerat (ISO)<br>(S)-α-Ciano-3-fenoxi-benzil-(S)-2-(4-klórfenil)-izovalerát | | – | 66230-04-4 | T; R23/25<br>R43<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 23/25-43-50/53<br>S: (1/2-)24-36/37/39-45-60-61 | | |
| 650-041-00-9 | Triaszulfuron (ISO)<br>1-[2-(2-Klóretoxi)fenilszulfonil]-3-(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il) karbamid | | – | 82097-50-5 | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60-61 | | |

1. D. MELLÉKLET

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 006-090-00-8 | 2-(3-jódprop-2-in-1-iloxi)etil fenil-karbamát | | 408-010-0 | 88558-41-2 | Xn; R20<br>Xi; R41<br>R52-53 | Xn<br>R: 20-41-52/53<br>S: (2-)22-26-39-61 | | |
| 014-016-00-0 | A következők keveréke:1,3-dihex-5-en-1-il-1,1,3,3-tetrametil-disziloxán; 1,3-dihex-n-en-1-il-1,1,3,3-tetrametil-disziloxán | | 406-490-6 | – | N; R51-53 | N<br>R: 51/53<br>S: 61 | | |
| 015-164-00-9 | kalcium-P, P'-(1-hidroxietilén)bisz (hidrogén-foszfonát)dihidrát | | 400-480-5 | 36669-85-9 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 015-165-00-4 | A következők keveréke: tiobisz(4,1-fenilén)-S, S, S, S'-tetrafenil-diszulfonium-biszhexafluor-foszfát; difenil (4-feniltiofenil)szulfonium hexafluor-foszfát | | 404-986-7 | – | Xi; R41<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 41-50/53<br>S: (2-)15-26-39-60-61 | | |
| 015-166-00-X | 3,9-bisz(2,6-di-tercier-butil-4-metilfenoxi)-2,4,8,10-tetraoxa-3,9-difoszfaspiro[5,5] undekán | | 410-290-4 | 80693-00-1 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 015-167-00-5 | 3-(hidroxifenil-foszfinil)propán sav | | 411-200-6 | 14657-64-8 | Xi; R41 | Xi<br>R: 41<br>S: (2-)26-39 | | |
| 601-050-00-1 | Benzol, $C_{10-13}$-alkil származékok | | 267-051-0 | 67774-74-7 | N; R50 | N<br>R: 50<br>S: 61 | | |
| 601-051-00-7 | 4-fenilbut-1-én | | 405-980-7 | 768-56-9 | Xi; R38<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 38-51/53<br>S: (2-)37-61 | | |
| 602-083-00-4 | difenil éter, pentabróm származék pentabróm-difenil éter | | 251-084-2 | 32534-81-9 | Xn; R48/21/22<br>R64<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 48/21/22-50/53-64<br>S: (1/2-)36/37-45-60-61 | | |
| 602-084-00-X | 1,1-Diklór-1-monofluoretán | | 404-080-1 | 1717-00-6 | N; R52-53-59 | N<br>R: 52/53-59<br>S: 59-61 | | |
| 603-128-00-0 | 2-(fenilmetoxi)naftalin | | 405-490-3 | 613-62-7 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 603-129-00-6 | 1-tercier-butoxipropan-2-ol | | 406-180-0 | 57018-52-7 | R10<br>Xi; R41 | Xi<br>R: 10-41<br>S: (2-)26-39 | | |
| 603-130-00-1 | A következő izomerek keveréke:α-((dimetil)bifenil)-ω-hidroxipoli (oxietilén) | | 406-325-8 | – | Xn; R22<br>R52-53 | Xn<br>R: 22-52/53<br>S: (2-)39-61 | | |
| 603-131-00-7 | A következők 3:1-es keveréke: 1-dezoxi-1-[metil-(1-oxododecil)amino]-D-glucitol; 1-dezoxi-1-[metil-(1-oxotetra-decil)amino]-D-glucitol | | 407-290-1 | – | Xi; R41 | Xi<br>R:41<br>S: (2-)26-39 | | |
| 603-132-00-2 | 2-hidroximetil-9-metil-6-(1-metiletil)-1,4-dioxaspirol[4,5]dekán | | 408-200-3 | 63187-91-7 | Xi; R38-41<br>R52-53 | Xi<br>R: 38-41-52/53<br>S: (2-)26-37/39-61 | | |
| 603-133-00-8 | A következők keveréke: 3-[4-amino-2-klór-5-nitrofenil)amino]-propán-1,2-diol; 3,3'-(2-klór-5-nitro-1,4-feniléndiimino)bisz(propán-1,2-diol) | | 408-240-1 | – | Xn; R22<br>R52-53 | Xn<br>R: 22-52/53<br>S: (2-)22-36-61 | | |
| 603-134-00-3 | Helyettesített dodecil és/vagy tetradecil, difenil éterek keveréke. Az anyagot a Friedel Crafts-féle reakció hozza létre. A katalizátort eltávolítják a reakció termékből. A definil étert C1-C10-es alkil csoportok helyettesítik. Az alkil csoportok kötése rendszertelen C1 és C6 között. Lineáris C12 és C14, 50/50 használata. | | 410-450-3 | – | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 603-135-00-9 | bisz[[2,2', 2-nitrilotrisz[etanolát]]-1-N, O]bisz[2-(2-metoxietoxi)etoxi]-titán | | 410-500-4 | – | Xi; R41<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 41-51/53<br>S: (2-)26-39-61 | | |
| 603-136-00-4 | 3-((4-bisz(2-hidroxietil)amino)-2-nitrofenil)amino)-1-propanol | | 410-910-3 | 104226-19-9 | R43<br>R52-53 | Xi<br>R: 43-52/53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 603-137-00-X | Az alábbiak keveréke: 1-dezoxi-1-[metil-(1-oxohexadecil[amino]-D-szorbit; 1-dezoxi-1-[metil-(1-oxooktadecil)amino]-D-szorbit | | 411-130-6 | – | Xi; R41 | Xi<br>R: 41<br>S: (2-)26-39 | | |
| 603-138-00-5 | 3-(2,2-dimetil-3-hidroxipropil)toluol alt.): 2,2-dimetil-3-(3-metilfenil)propanol | | 403-140-4 | 103694-68-4 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 604-050-00-X | 4-klór-o-krezol<br>4-klór-2-metil fenol | | 216-381-3 | 1570-64-5 | T; R23<br>C; R35<br>N; R50 | T; C; N<br>R: 23-35-50<br>S: (1/2-)26-36/37/39-45-61 | C ≥ 25 %: T;<br>C; R23-35<br>10 % ≤ C < 25 %:<br>C; R20-35<br>5 % ≤ C < 10 %:<br>C; R20-34<br>3 % ≤ C < 5 %:<br>Xn; R20-36/37/38<br>1 %≤C< 3 %:<br>Xi; R36/37/38 | |
| 604-051-00-5 | 3,5-bisz((3,5-di-tercier-butil-4-hidroxi) benzil)-2,4,6-trimetilfenol | | 401-110-5 | 87113-78-8 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 604-052-00-0 | 2,2'-metilénbisz(5-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol | | 403-800-1 | 103597-45-1 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 604-053-00-6 | 2-metil-4-(1,1-dimetiletil)-6-(1-metil-pentadecil)-fenol | | 410-760-9 | 157661-93-3 | Xi; R38<br>R43<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 38-43-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 604-054-00-1 | Az alábbiak keveréke: 2-metoxi-4-(tetrahidro-4-metilén-2H-piran-2-il)-fenol; 4-(3,6-dihidro-4-metil-2H-piran-2-il)-2-metoxifenol | | 412-020-0 | – | R43<br>R52-53 | Xi<br>R: 43-52/53<br>S: (2-)22-36-37 | | |
| 604-055-00-7 | 2,2'-((3,5', 5,5'-tetrametil-(1,1'-bifenil)- 4,4'-diil)-bisz(oximetilén))-bisz-oxirán | | 413-900-7 | 85954-11-6 | Muta. Kat. 3; R40 | Xn<br>R: 40<br>S: (2-)22-36-37 | | |
| 605-027-00-7 | Az alábbiak keveréke: 3a, 4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H-indén-6-karboxaldehid; 3a, 4,5,6,7,7a-hexahidro-4,7-metano-1H-indén-5-karboxaldehid | | 410-480-7 | – | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 606-051-00-0 | 4-pentilciklo-hexanon | | 406-670-4 | 61203-83-6 | N; R51-53 | N<br>R: 51/53<br>S: 61 | | |
| 606-052-00-6 | 4-(N, N-dibutilamino)-2-hidrox-2'-karboxi-benzofenoni | | 410-410-5 | 54574-82-2 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 607-272-00-5 | fluoroxypyr-meptyl (ISO) [1]<br>fluroxypyr-butometyl (ISO) [2]<br>metilheptil, O-((4-amino-3,5-diklór-6-fluor-2-piridiloxi) acetát [1]<br>2-butoxi-1-metiletil, O-(4-amino-3,5-diklór-6-fluor-2-piridiloxi) acetát [2] | | 279-752-9 [1]<br>– | 81406-37-3 [1]<br>154486-27-8 [2] | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 607-273-00-0 | ammónium-7-(2,6-dimetil-8-(2,2-dimetil-butiriloxi)- 1,2,6,7,8,8a-hexahidro-1-naftil)-3,5-dihidroxi-heptanoát | | 404-520-2 | – | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 607-274-00-6 | 2-(N-benzil-N-metilamino)etil-3-amino-2-butanoát | | 405-350-1 | 54527-73-0 | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 607-275-00-1 | nátrium benzoil-oxibenzol-4-szulfonát | | 405-450-5 | 66531-87-1 | R43 | Xi<br>R: 43<br>S: (2-)24-37 | | |
| 607-276-00-7 | bisz[1-metilimidazol)-(2-etilhexanoát)], cink komplex vegyület | | 405-635-0 | – | Xi; R38-41<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 38-41-50/53<br>S: (2-)26-37/39-60-61 | | |
| 607-277-00-2 | A következők keveréke:<br>2-(hexiltio)etilaminhidroklorid; nátrium propionát | | 405-720-2 | – | Xn R22<br>Xi; R41<br>R43<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-41-43-51/53<br>S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 607-278-00-8 | Nátrium fenetil-naftalin-szulfonát; nátrium naftiletil-benzo-szulfonát izomerjeinek keveréke | | 405-760-0 | – | Xi; R41<br>R43<br>R52-53 | Xi<br>R: 41-43-52/53<br>S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 607-279-00-3 | n-oktadecil-amino-dietil bisz(hidrogénmaleát); n-oktadecil-amino-dietil hidrogén maleát hidrogén-ftalát keveréke | | 405-960-8 | – | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>24-37-61 | | |
| 607-280-00-9 | nátrium 4-klór-1-hidroxibután-1-szulfonát | | 406-190-5 | 54322-20-2 | Xn; R22<br>Xi; R36<br>R43 | Xn<br>R: 22-36-43<br>S: (2-)22-26-36/37 | | |
| 607-281-00-4 | Elágazó és lineáris C7-C9 alkil3-[3-(2H-benzotriazol-2-il)-5-(1,1-dimetiletil)-4-hidroxifenil]propionátok keveréke | | 407-000-3 | 127519-17-9 | N; R51-53 | N<br>R: 51/53<br>S: 61 | | |
| 607-282-00-X | 2-acetoximetil-4-benziloxibut-1-il acetát | | 407-140-5 | 131266-10-9 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 607-283-00-5 | E-etil-4-oxo-4-fenilkrotonát | | 408-040-4 | 15121-89-8 | Xn; R21/22<br>Xi; R38-41<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 21/22-38-41-43-50/53<br>S: (2-)26-36-37/39-60-61 | | |
| 607-284-00-0 | A következők 9:1-es keveréke: nátrium 3,3'-(1,4-fenilénbisz(karbonilimino-3,1-propándiilimino))bisz(10-amino-6,13-diklór)- 4,11-trifeno-dioxazin-diszulfonát): lítium 3,3'-(1,4-fenilénbisz-(karbomilimino-3,1-propándiil-imino))bisz(10-amino-6,13-diklór)- 4-11-trifeno-dioxazin-diszulfonát | | 410-040-4 | 136213-76-8 | N; R51-53 | N<br>R: 51/53<br>S: 61 | | |
| 607-285-00-6 | Az alábbiak keveréke: 7-(((3-aminofenil)szulfonil)amino)-naftalin-1,3-diszulfonsav; nátrium 7-(((3-aminofenil)szulfonil)amino)-naftalin-1,3-diszulfonát; kálium7-(((3-aminofenil)szulfonil)amino)-naftalin-1,3-diszulfonát | | 410-065-0 | – | R43 | Xi<br>R: 43<br>S: (2-)22-24-37 | | |
| 607-286-00-1 | A következők keveréke: nátrium/kálium 7-[[[3-[[4-((2-hidroxi-naftil)azo)fenil]azo]fenil]szulfonil]amino]-naftalin-1,3-diszulfonát | | 410-070-8 | 141880-36-6 | R43<br>R52-53 | Xi<br>R: 43-52/53<br>S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 607-287-00-7 | O'-metil O-(1-metil-2-metakriloil-oxi-etil)-1,2,3,6-tetrahidro-ftalát | | 410-140-8 | – | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 607-288-00-2 | Tetranátrium (c-(3-(1-(3-(e-6-diklór-5-ciano-pirimidin-f-il(metil)amino)propil-1,6-dihidro-2-hidroxi-4-metil-6-oxo-3-piridilazo)-4-szulfonáto-fenil-szulfamoil) ftalocianin-a, b, d-triszulfonáto(6-)) nikkel (II), ahol az a értéke 1 vagy 2 vagy 3 vagy 4, b értéke 8 vagy 9 vagy 10 vagy 11, c értéke 15 vagy 16 vagy 17 vagy 18, d értéke 22 vagy 23 vagy 24 vagy 25, és ahol az e és f együttesen 2 és 4, illetve 4 és 2. | | 410-160-7 | 148732-74-5 | Xi; R36<br>R43<br>R52-53 | Xi<br>R: 36-43-52/53<br>S: (2-)22-26-36/37-61 | | |
| 607-288-00-8 | 3-(3-(4-(2,4-bisz(1,1-dimetilpropil)fenoxi) butilamino-karbonil-4-hidroxi-1-naftalinil) tio)propán sav | | 410-370-9 | 105488-33-3 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 607-290-00-3 | A következők keveréke (az arány nem ismert): ammónium 1-C14-C18-alkiloxi-karbonil-2-(3-alliloxi-2-hidroxi-propoxi-karbonil)etán-1-szulfonát; ammónium 2-C14-C18-akiloxi-karbonil-1-(3-alliloxi-2-hidroxi-propoxi-karbonil)etán-1-szulfonát | | 410-540-2 | – | Xi; R38<br>R43<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 38-43-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 607-291-00-9 | dodecil-ω-(C5/6-cikloalkil)alkil karboxilát | | 410-630-1 | 104051-92-5 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 607-292-00-4 | Az alábbiak keveréke: [1-(metoximetil)-2-(C12-alkoxi)-etoxi]ecetsav; [1-(metoximetil)-2-(C14-alkoxi)-etoxi] ecetsav | | 410-640-6 | – | Xi; R38-41<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 38-41-50/53<br>S: (2-)26-37/39-60-61 | | |
| 607-293-00-X | A következők keveréke: N-amino-etil-piperazonium mono-2,4,6-trimetil-nonil-difenil éter di-szulfonát; N-amino-etil-piperazonium di-2,4,6-trimetil-nonil-difenil éter di-szulfonát | | 410-650-0 | – | XI; R41<br>R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 41-43-51/53<br>S: (2-)26-36/37/39-61 | | |
| 607-294-00-5 | nátrium-2-benzoiloxi-1-hidroxietán-szulfonát | | 410-680-4 | – | R43 | Xi<br>R: 43<br>S: (2-)24-37 | | |
| 607-295-00-0 | A következők keveréke: tetranátrium foszfonoetán-1,2-dikarboxilát; hexanátrium foszfonobután-1,2,3,4-tetra-karboxilát | | 410-800-5 | – | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 607-296-00-6 | A következők keveréke: pentaeritrol tetraészterek heptánsavval és 2-etilhexán savval | | 410-830-9 | – | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 607-297-00-1 | (E-E)-3,3'-(1,4-fenilén-dimetilidén)bisz (2-oxobornán-10-szulfonsav) | | 410-960-6 | 92761-26-7 | Xi; R41 | Xi<br>R: 41<br>S: (2-)26-39 | | |
| 607-298-00-7 | 2-(trimetilammonium)etoxi-karboxi-benzol-4-szulfonát | | 411-010-3 | – | R43 | Xi<br>R: 43<br>S: (2-)22-36/37 | | |
| 607-299-00-2 | metil 3-(acetiltio)-2-metil-propanoát | | 411-040-7 | 97101-46-7 | Xn; R22<br>R43<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-43-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 607-300-00-6 | trinátrium [2-(5-klór-2,6-difluorpirimidin-4-ilamino)-5-(b-szulfamoil-c, d-szulfonát-ftalocianin-a-il-K4, N29, N30, N31, N32-szufonilamino)benzoáto(5-)[kuprát(II) ahol 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<br>R: 43<br>S: (2-)22-24-37 | | |
| 607-301-00-1 | A következők keveréke: dodekánsav; dodekánsav poli(1-7)laktát észterei | | 411-860-5 | – | Xi; R38-41<br>R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 38-41-43-51/53<br>S: (2-)24-26-37/39-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 607-302-00-7 | A következők keveréke: tetradekánsav; tetradekánsav poli(1-7)laktát észterei | | 411-910-6 | – | Xi; R38-41<br>R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 38-41-43-51/53<br>S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 607-303-00-2 | 1-ciklopropil-6,7-difluor-1,4-dihidro-4-oxikinolin-3-karboxil sav | | 413-760-7 | 931077-30-3 | Szap. Kat. 3; R62<br>R52-53 | Xn<br>R: 62-52/53<br>S: (2-)22-36/37-61 | | |
| 608-023-00-3 | 4-(4-klórfenil)-2-fenil-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]butánnitril | | 406-140-2 | 114369-43-6 | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60-61 | | |
| 608-024-00-9 | 2-(4-(N-butil-N-fenetilamino)fenil)etilén-1,1,2-trikarbonitril | | 407-650-8 | 97460-76-9 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 608-025-00-4 | 2-nitro-4,5-bisz(benziloxi)fenilaceto-nitril | | 410-970-0 | 117568-27-1 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 609-053-00-X | hidrazin-tri-nitrometán | | 414-850-9 | – | E; R3<br>O; R8<br>Karc. Kat. 2; R45<br>T; R23/25<br>R43 | E; T<br>R: 45-3-8-23/25-43<br>S: 53-45 | | |
| 610-010-00-2 | 2-bróm-1-(2-furil)-2-nitroetilén | | 406-110-9 | 35950-52-8 | Xn; R22-48/22<br>C; R34<br>R43<br>N; R50-53 | C; N<br>R: 22-34-43-48/22-50/53<br>S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 611-043-00-5 | A következők 2:1:1-es keveréke: trinátrium N(1')-N(2):N(1")-N(2")-η-6-[2-amino-4-(vagy 6)-hidroxi-(vagy 4-amino-2-hidroxi) fenilazo]-6"(1-karbaniloil-2-hidroxiprop-1-enilazo)- 5', 5'"-diszulfamoil-3,3"-diszulfonáto-bisz(naftalin-2,1'-azobenzol-1,2'-diolát-O(1), O(2'))-kromát; trinátrium N(1')-N(2):N(1'")-N(2")-η-6,6"-bisz(1-karbaniloil-2-hidroxiprop-1-enil-azol)- 5', 5'"-diszulfamoil-3,3"-diszulfonáto-bisz(naftalin-2,1'azobenzol-1,2'-diolát O(1), O(2'))-kromát; trinátrium N(1')-N(2):N(1'")-N(2")-η-6,6"-bisz[2-amino-4-(vagy 6)-hidroxi-(vagy 4-amino-2-hidroxi)fenilazo]5, 5'"-diszulfamoil-3,3"-diszulfonát-bisz(naftalin-2,1'-azobenzol-1,2'-diolát-O(1), O(2'))-kromát | | 402-850-1 | | Xi; R41<br>52-53 | Xi<br>R: 41-52/53<br>S: (2-)26-39-61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 611-044-00-0 | A következők keveréke: tercier-alkil (C12-C14)ammonium-bisz[1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalinoláto(2-)]-kromát(1-); tercier alkil (C12-C14) ammónium bisz[1-[(2-hidroxi-4-nitrofenil] azo]-2-naftalinoláto(2-)]-kromát(1-); tercier-alkil(C12-C14)ammónium [1-[[5(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil]azo]-2-naftalinoláto(2-)]-kromát (1-); tercier alkil(C12-C14)ammónium-[[1-[(2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalinoláto(2-)]-[1(2-hidroxi-5-nitrofenil) azo]-2-naftalinoláto(2-)]]-kromát(1-); tercier-alkil(C12-C14)ammónium-[[1-[[5-(1,1-dimetilpropil)-2-hidroxi-3-nitrofenil] azo]-2-naftalinoláto(2-)]-[1-[2-hidroxi-5-nitrofenil)azo]-2-naftalinoláto(2-)]]-kromát (1-); tercier-alkil(C12-C14)ammónium ((1-4(vagy 5)-nitro-2-oxidofenilazo)-2-naftoláto) (1-(3-nitro-2-oxido-5-pentil-fenilazo)-2-naftoláto))kromát(1-) | | 403-720-7 | 117527-94-3 | N; R51-53 | N<br>R: 51/53<br>S: 61 | | |
| 611-045-00-6 | 2-[4-[N-(4-acetoxibutil)-N-etil]amino-2-metilfenilazo]-3-ecetil-5-nitrotiofén | | 404-830-8 | – | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 611-046-00-1 | 4,4'-diamino-2-metilazobenzol | | 407-590-2 | 43151-99-1 | T; R25<br>Xn; R48/22<br>R43<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 25-43-48/22-50/53<br>S: (1/2-)22-28-36/37-45-60-61 | | |
| 611-047-00-7 | A következők 1:1-es keveréke: 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxietil)amino]fenil] azo]- 5,6-diklórbenzo-tiazol; 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]- 6,7-diklórbenzo-tiazol | | 407-890-3 | 111381-11-4 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 611-048-00-2 | A következők 1:1-es keveréke: 2-[[4-[bisz(2-acetoxietil)amino]fenil]azo]- 5,6-diklórbenzo-tiazol; 2-[[4-[bisz(2-ecetoxietil)amino]fenil]azo]- 6,7-diklórbenzo-tiazol | | 407-900-6 | 111381-12-5 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 611-049-00-8 | 7-[4-(3-dietilamino-propilamino)-6-(3-dietilammonio-propilamino)- 1,3,5-triazin-2-ilamino]-4-hidroxi-3-(4-fenilazo-fanilazo)-naftalin-2-szufonát, ecetsav, tejsav (2:1:1) | | 408-000-6 | 118658-98-3 | Xn; R48/22<br>R43<br>R52-53 | Xn<br>R: 43-48/22-52/53<br>S: (2-)22-36/37-61 | | |
| 611-051-00-9 | 2-(4-N-etil-N-(2-hidroxi)etil)amino-2-metilfenil)azo-6-metoxi-3-metilbenzo-tiazolium klorid | | 411-110-7 | 136213-74-6 | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60-61 | | |
| 611-052-00-4 | mononátrium akva-[5-[[2,4-dihidroxi-5-[(2-hidroxi-3,5-dinitrofenil)azo]fenil]azo]-2-naftalinszulfonát] vas komplex vegyület | | 400-720-9 | – | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 612-156-00-2 | A következők keveréke: trihexadecil-metilammonium klorid; dihexadecil-dimetilammonium klorid | | 405-620-9 | – | Xi; R41<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 41-50/53<br>S: (2-)26-39-60-61 | | |
| 612-157-00-8 | (Z)-1-benzo[b]tien-2-iletanon oxim hidroklorid | | 410-780-8 | – | Xn; R22-48/22<br>Xi; R41<br>R43<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 22-41-43-48/22-51/53<br>S: (2-)22-26-36/37/39-61 | | |
| 612-158-00-3 | A következők keveréke: bisz(5-dedecil-2-hidroxibenzál-doximát) réz (II) C12-alkil csoport, elágazott; 4-dodecilszalicil-aldoxim | | 410-820-4 | – | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 612-159-00-9 | A következők reakció termékei: trimetil-hexametilén-diamin (az alábbiak keveréke 2,2,4-trimetil-1,6-hexándiamin és2,4,4-trimetil-1,6-hexándiamin, EINECS jegyzékben szereplő), Epoxid 8 (mono[(C10-C16-alkiloxi)metil]oxirán származékok) és p-toluol szulfonsav | | 410-880-1 | – | Xn; R22<br>C; R34<br>N; R50-53 | C; N<br>R: 22-34-50/53<br>S: (1/2-)23-26-36/37/39-45-60-61 | | |
| 613-149-00-7 | 2-tercier-butil-5-(4-tercier-butilbenziltio)-4-klórpirizdazin-3(2H)-on | | 405-700-3 | 96489-71-3 | T; R23/25<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 23/25-50/53<br>S: (1/2-)36/37-45-60-61 | | |
| 613-150-00-2 | 2,2'-[3,3'-(piperazin-1,4-diil)dipropil]bisz (1H-bezimidazo[2,1-b]benzo[1, m, n] [3,8] fenantrolin-1,3,6-trion | | 406-295-6 | – | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 613-151-00-8 | 1-(3-meziloxi-5-tritiloximetil]-2-D-treofuril) timin | | 406-360-9 | 104218-44-2 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 613-152-00-3 | fenil N-(4,6-dimetoxi-pirimidin-2-il) karbamát | | 406-600-2 | 89392-03-0 | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 613-153-00-9 | 2,3,5-triklórpiridin | | 407-270-2 | 16063-70-0 | R52-53 | R: 52/53<br>S: 61 | | |
| 613-154-00-4 | 2-amino-4-klór-6-metoxipirimidin | | 410-050-9 | 5734-64-5 | Xn; R22 | Xn<br>R: 22<br>S: (2-)22 | | |
| 613-155-00-X | 5-klór-2,3-difluorpiridin | | 410-090-7 | 89402-43-7 | R10<br>Xn; R22<br>R52-53 | Xn<br>R: 10-22-52/53<br>S: (2-)23-36-61 | | |
| 613-156-00-5 | 2-butil-4-klór-5-formilimidazol | | 410-260-0 | 83857-96-9 | R43<br>N; R51-53 | Xi; N<br>R: 43-51/53<br>S: (2-)24-37-61 | | |
| 613-157-00-0 | 2,4-diamino-5-metoximetil-pirimidin | | 410-330-0 | 54236-98-5 | Xn; R22-48/22<br>Xi; R36 | Xn<br>R: 22-36-48/22<br>S: (2-)22-26-36 | | |
| 613-158-00-6 | 2,3-diklór-5-trifluormetil-piridin | | 410-340-5 | 69045-84-7 | Xn; R20/22<br>Xi; R41<br>R43<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 20/22-41-43-51/53<br>S: (2-)24-26-37/39-61 | | |
| 613-159-00-1 | 4-[2-[4-(1,1-dimetiletil)fenil]-etoxi] kinazolin | | 410-580-0 | 120928-09-8 | T; R25<br>Xn; R20<br>N; R50-53 | T; N<br>R: 20-25-50/53<br>S: (1/2-)37-45-60-61 | | |
| 613-160-00-7 | (IS)-2-metil-2,5-diazobiciklo[2,2,1]heptán dihidrobromid | | 411-000-9 | 125224-62-6 | R43 | Xi<br>R: 43<br>S: (2-)24-37 | | |
| 615-022-00-1 | metil 3-izocianáto-szulfonil-2-tiofén-karboxilát | | 410-550-7 | 79277-18-2 | E; R2<br>R14<br>Xn; R48/22<br>R42/43 | E; Xn<br>R: 2-14-42/43-48/22<br>S: (2-)22-30-35-36/37 | | |

| Index szám | Kémiai név | Anyagokra vonatkozó megjegyzések | EK szám | CAS szám | Osztályozás | Feliratozás | Koncentráció határok | Készítményekkel kapcsolatos megjegyzések |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 615-023-00-7 | 2-(izocianáto-szulfonilmetil)benzoe savmetil észter; (alt.): metil 2-(izocianáto-szulfonilmetil)benzoát | | 410-900-9 | 83056-32-0 | R10<br>R14<br>Muta. Kat. 3; R40<br>Xn; R20-48/22<br>Xi; R41<br>R42 | Xn<br>R: 10-14-20-40-41-42-48/22<br>S: (2-)23-26-36/37/39 | | |
| 616-044-00-4 | N-(3,5-diklór-4-etil-2-hidroxifenil)-2-(3-pentadecil-fenoxi)-butánamid | | 402-510-2 | – | N; R51-53 | N<br>R: 51/53<br>S: 61 | | |
| 616-045-00-X | 2'-(4-klór-3-ciano-5-formil-2-tienilazo)-5'-dietilamino-2-metoxi-acetanilin | | 405-190-2 | 122371-93-1 | R43<br>R53 | Xi<br>R: 43-53<br>S: (2-)22-24-37-61 | | |
| 616-046-00-5 | N-(2-(6-klór-7-metilpirazolo(1,5-b)- 1,2,4-triazol-4-il)propil)-2-(2,4-di-tercier-pentilpenoxi)oktánamid | | 406-390-2 | – | N; R50-53 | N<br>R: 50/53<br>S: 60-61 | | |
| 616-047-00-0 | A következők keveréke: 2,2',2'',2'''-(etiléndinitrilo-tetrakisz-N-N-di(C16) alkilacetamid; 2,2',2'',2'''-etiléndinitrilo-tetrakisz-N, N-di(C18)alkil-acetamid | | 406-640-0 | – | R43 | Xi<br>R: 43<br>S: (2-)24-37 | | |
| 616-048-00-6 | 3'-trifluormetil-hidrobutil-anilid | | 406-740-4 | 1939-27-1 | Xn; R48/22<br>N; R51-53 | Xn; N<br>R: 48/22-51/53<br>S: (2-)22-36-61 | | |
| 616-049-00-1 | 2-(2,4-bisz(1,1-dimetiletil)fenoxi)-N-(3,5-dklór-4-etil-2-hidroxifenil)-hexánamid | | 408-150-2 | 99141-89-6 | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 616-050-00-7 | N-[2,5-diklór-4-(1,1,2,3,3,3-hexafluor-propoxi)-fenil-aminokarbonil]- 2,6-difluor-benzamid | | 410-690-9 | 103055-07-8 | R43<br>N; R50-53 | Xi; N<br>R: 43-50/53<br>S: (2-)24-37-60-61 | | |
| 616-051-00-2 | A következők keveréke: 2,4 -bisz(N'-(4-metilfenil)-ureido)-toluol; 2,6 -bisz(N'-(4-metilfenil)-ureido)-toluol | | 411-070-0 | – | R53 | R: 53<br>S: 61 | | |
| 617-015-00-9 | bisz(4-metilbenzoil)peroxid | | 407-950-9 | 895-85-2 | E; R2<br>O; R7<br>N; R50-53 | E; N<br>R: 2-7-50/53<br>S: (2-)7-14-36/37/39-47-60-61 | | |
| 650-032-00-X | cyproconazole (ISO)<br>(2RS, 3RS;2RS, 3SR)-2-(4-klórfenil)-3-ciklopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)bután-2-ol | | – | 94361-06-5 | Szap. Kat. 3; R63<br>Xn; R22<br>N; R50-53 | Xn; N<br>R: 22-50/53-63<br>S: (2-)36/37-60-61 | | |

*2. MELLÉKLET*

Lásd: A Bizottság 2001/59/EK irányelve, HL L 225., 2001.08.21., 1. o.

*3. A. MELLÉKLET*

Lásd: A Bizottság 2001/59/EK irányelve, HL L 225., 2001.08.21., 1. o.

*3. B. MELLÉKLET*

Lásd: A Bizottság 2001/59/EK irányelve, HL L 225., 2001.08.21., 1. o.

*4. A. MELLÉKLET*

## „B.10. MUTAGENITÁS –KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VITRO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

### 1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 473-nak, kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálata emlősökön (1997).

### 1.1. BEVEZETÉS

Az *in vitro* kromoszóma-rendellenesség vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoznak tenyésztett emlősállat-sejtekben (1), (2), (3). A szerkezeti rendellenességek kétféle típusúak lehetnek, kromoszóma vagy kromatid. A mutációt előidéző kémiai anyagok többsége esetében az előidézett rendellenességek kromatid típusúak, de kromoszóma típusúak is előfordulnak. A poliploida gyakoriságának növekedése azt jelentheti, hogy valamely kémiai anyag potenciálisan előidézhet számszerű rendellenességeket. Azonban e módszert nem számszerű rendellenességek mérésére tervezték, és rendesen nem is erre a célra használják. A kromoszóma mutációk és ehhez hasonló folyamatok számos emberi genetikai betegség okozói, bizonyítékok szólnak amellett, hogy a kromoszóma mutáció és az ehhez hasonló folyamatok, amelyek változásokat okoznak az onkogénekben és a tumor szuppresszor génekben, szerepet játszanak a rák előidézésében emberekben és kísérleti állatokban.

A kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálata megállapodott sejtvonalakon, sejttörzseken vagy primer sejtkultúrákon végezhető. A vizsgálathoz használt sejteket a tenyészetben a növekedési képesség, a kariotípus stabilitása, a kromoszómaszám, kromoszómák alaki változatossága és a kromoszóma-rendellenességek spontán gyakorisága alapján kell kiválasztani.

Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint szükségessé teszik a metabolikus aktiválás valamilyen külső forrásának használatát. Ezen metabolikus aktiváló rendszer nem tudja teljesen utánozni az emlősállatokban *in vivo* meglévő körülményeket. Körültekintően kell eljárni, el kell kerülni azon körülményeket, amelyek olyan pozitív eredményekhez vezethetnének, amelyek nem tükrözik a belső mutagenitást, és a pH-érték ill ozmolalitás változásából vagy a magas citotoxicitási szintből származhatnak (4) (5).

E vizsgálatot azon anyagok szűrésére lehet használni, amelyek mutációt idézhetnek elő (potenciális mutagének) és rákot okozhatnak (karcinogének) emlősállatok esetében. Az e vizsgálatban pozitív eredményt adó számos vegyület emlősállatok esetében rákkeltő vegyület; azonban nincs tökéletes korreláció az itt ismertetett vizsgálat és a karciogenitás között. A korreláció függ a vizsgált anyag kémiai osztályától és egyre több bizonyíték van arra, hogy léteznek olyan rákkeltő anyagok, amelyeket e vizsgálat nem észlel, mivel úgy tűnik, hogy ezek nem a közvetlen DNS károsító hatás révén, hanem más mechanizmussal fejtik ki a hatásukat.

Lásd még az Általános bevezetés B részét is.

### 1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Kromatid típusú rendellenesség:** szerkezeti kromoszóma-károsodás, amely egy kromatid törésében vagy kromatidok közötti törésben és újraegyesítésben nyilvánul meg.

**Kromoszóma típusú rendellenesség:** szerkezeti kromoszóma-károsodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

**Endoreduplikáció:** az a folyamat, amely során valamely DNS replikációt követően a sejtmag nem lép be a mitózis fázisába, hanem egy másik S fázist indít. Az eredmény 4, 8, 16,… kromatiddal rendelkező kromoszómák.

**Gap:** egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus sérülés.

**Mitotikus index:** a metafázisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya; e populáció proliferációja mértékének jelzése.

**Számszerű rendellenesség:** a kromoszómák számának eltérése a felhasznált sejteket jellemző normál számértéktől.

**Poliploida:** a haploid kromoszómaszám (n) egészszámú, de nem diploid (azaz 3n, 4n, és így tovább) megsokszorosódása.

**Szerkezeti rendellenesség:** a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében, mint a delíciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződés.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Sejttenyészeteket kezelnek a vizsgált anyaggal mind metabolikus aktiválóval, mind anélkül. Meghatározott időközönként metafázis blokkoló szerrel (például Colcemid$^{O}$ vagy kolchicin) kezelik a sejteket, majd az összegyűjtött, megfestett és metafázisban lévő sejteket mikroszkóp segítségével elemezni kell, azért hogy a kromoszóma-rendellenességet megvizsgáljuk.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *Sejtek*

Különféle törzsek, sejtvonalak vagy primer sejttenyészetek, emberi sejteket is ideértve, használhatók (például kínai hörcsög fibroblasztok, ember vagy más emlős perifériás limfociták).

1.4.1.2. *Tápfolyadékok és tenyésztési körülmények*

Megfelelő tápfolyadékokat és inkubációs feltételeket (tenyésztő edények, $CO_2$ koncentráció, hőmérséklet és páratartalom) kell alkalmazni a tenyészetek fenntartására. A megállapodott sejtvonalaknál és -törzseknél rendszeresen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitását és a mycoplazma fertőzöttségét, nem szabad a mycoplazmát használni, ha fertőzött. Ismerni kell a kiválasztott sejtek normális sejtciklus időtartamát az adott inkubációs feltételek mellett.

1.4.1.3. *A tenyészetek előkészítése*

Megállapodott sejtvonalak és -törzsek: a sejteket törzstenyészetekből fel kell szaporítani, majd leültetni tápfolyadékba olyan sejtszámmal, hogy a tenyészetek ne érjék el a konfluens állapotot az összegyűjtés ideje előtt, és ezeket 37 °C hőmérsékleten inkubálni kell.

Limfociták: alvadásgátlóval (például heparin) kezelt teljes vért vagy egészséges donoroktól nyert szeparált limfocitákat adnak hozzá mitogén tartalmú táptalajhoz (például phytohaemagglutinin), és 37 °C hőmérsékleten inkubálják.

1.4.1.4. *Metabolikus aktiválás*

A sejteket exponálni kell a vizsgált anyaggal mind egy megfelelő metabolikus aktiválóval, mind anélkül. A legáltalánosabban használt rendszer a rágcsálóknak enziminducerrel [ilyen például az Aroclor 1254 (6), (7), (8), (9) vagy fenobarbiturát és ß-naftoflavon kombinációjával (10), (11), (12)] kezelt májából elkészített, kofaktor-kiegészítésű posztmitokondriális frakció (S9).

A posztmitokondriális frakciót rendszerint 1-10 térfogatszázalék tartományba eső koncentrációkban kell használni a végtérfogatban. Valamely metabolikus aktiváló rendszer állapota függhet a vizsgált kémiai anyag osztályától. Néhány esetben célszerű a posztmitokondriális frakció egynél több koncentrációjának használata.

Számos fejlesztés, ideértve a specifikus aktiváló enzimeket tartalmazó genetikailag módosított sejtvonalak létrehozását is, biztosíthatja az endogén aktiválás lehetőségét. A használt sejtvonalak kiválasztását tudományosan indokolni kell (például a vizsgált anyag anyagcseréjéhez a citokrom P450-es izoenzim alkalmazásának relevanciáját).

1.4.1.5. *Vizsgált anyag/előkészület*

A szilárd vizsgált anyagokat a sejtek kezelése előtt fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben és hígítani kell, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerekhez és/vagy hígíthatók kezelés előtt. A vizsgált anyagból friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát bizonyítják.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/Vivőanyag*

Az oldószernek/vivőanyagnak nem szabad olyan anyagnak lennie, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal, és nem befolyásolhatja a sejtek túlélését és az F9-es aktivitást. Jól ismert oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző adatokkal. Ahol csak lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni. Vízben instabil anyagok vizsgálatakor a használt szerves oldószereknek vízmenteseknek kell lenniük. A víz molekuláris szűrő segítségével távolítható el.

1.4.2.2. *Expozíciós koncentráció*

A legnagyobb koncentráció meghatározásakor figyelembe veendő kritériumok többek között a citotoxicitás, oldhatóság a vizsgálati rendszerben és pH érték ill. az ozmolalitás változásai.

A citotoxicitást a fő kísérletben metabolikus aktiválással és anélkül kell meghatározni a sejtintegritás és szaporodás megfelelő mutatóit használva; ilyenek például a konfluencia mértéke, életképes sejtek száma vagy a mitotikus index. Hasznosnak bizonyul, ha a citotoxitást és oldhatóságot előzetes kísérletben meghatározzuk.

Legalább három elemezhető koncentrációt kell használni. Ha az anyag citotoxikus, e koncentrációknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt; ez rendszerint azt jelenti, hogy a koncentrációk nem több, mint 2 és √10 közötti tényezővel különböznek egymástól. A sejtek begyűjtéskor a legnagyobb koncentrációnak jelentős csökkenést kell mutatnia a konfluencia mértékében, a sejtszámban vagy mitiotikus indexben (mindegyik nagyobb, mint 50 %). A mitiotikus index a citotoxikus/citosztatikus hatásokat csak közvetett módon jelzi, és függ attól, hogy a kezelés után mennyi idő telt el. Azonban a mitiotikus index elfogadható olyan szuszpenziós kultúráknál, amelyekben a toxicitás mérések nagyon körülményesek és gyakorlatilag megvalósíthatatlanok lehetnek. A sejtciklus kinetikára vonatkozó információk, ilyen például az átlagos generációs idő (average generation time, AGT), kiegészítő információkként használhatók. Azonban az AGT általános átlag, amely nem mindig fedi fel a megkésett szubpopulációk létezését, és még a kismértékű átlagos generációsidő-növekedés is nagyon jelentős késedelmet okozhat a rendellenességek optimális kimutatásának idejében.

A relatíve nem citotoxikus anyagok esetében a maximális vizsgált koncentrációnak 5 μm/ml-nek, 5 mg/ml-nek vagy 0,01 M-nek kell lennie, attól függően, hogy ezen értékek közül melyik a legalacsonyabb.

A relatíve rosszul oldódó anyagok esetében, amelyek a nem oldódó koncentrációnál alacsonyabb koncentrációkban nem toxikusak, a legnagyobb használt adagnak a kezelési időszak végén a végleges médiumban az oldékonyság határa fölötti koncentrációban kell lennie. Néhány esetben (például amikor a toxicitás csak a legalacsonyabb nem oldódó koncentrációnál magasabb koncentrációban jön létre) ajánlatos a vizsgálatot egynél több, látható csapadékot képező koncentrációval végrehajtani. Hasznosnak bizonyulhat az oldékonyságot a kezelés elején és végén meghatározni, mivel az változhat a vizsgálati rendszerben az expozíció időtartama során a sejtek, S9-es szérum stb. jelenléte miatt. A kicsapódás szabad szemmel észlelhető. A kicsapódásnak nem szabad befolyásolnia az értékelést.

1.4.2.3. *Negatív és pozitív kontrollok*

Minden egyes kísérletben egyidejűleg negatív és pozitív (oldószer és vivőanyag) kontrollt használunk, mindkettőt metabolikus aktiválással és anélkül is. Metabolikus aktiváló alkalmazásakor a pozitív kontrollanyagnak olyannak kell lennie, amely a mutagén reakció kiváltásához aktiválást igényel.

Pozitív kontrollanyagnak ismert klasztogént kell alkalmazni expozíciókoncentrációban annak érdekében, hogy reprodukálható és észlelhető növekedést okozzon (a háttérhez képest), amely a vizsgálati rendszer érzékenységét mutatja.

A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

| Metabolikus aktiválás | Anyag | CAS szám | Einecs szám |
|---|---|---|---|
| Exogén metabolikus aktiválás nélkül | Metil-metán-szulfonát | 66–27–3 | 200–625–0 |
| | Etil-metán-szulfonát | 62–50–0 | 200–536–7 |
| | N-etil-N-nitrozo-karbamid | 759–73–9 | 212–072–2 |
| | Mitomycin-C | 50–07–7 | 200–008–6 |
| | 4-Nitro-kinolin-N-oxid | 56–57–5 | 200–281–1 |
| Exogén metabolikus aktiválással | Benz[a]pirén | 50–32–8 | 200–028–5 |
| | Ciklofoszfamid | 50–18–0 | 200–015–4 |
| | Ciklofoszfamid monohidrát | 6055–19–2 | |

Más megfelelő pozitív kontrollanyagok is használhatók. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak.

Minden begyűjtés alkalmával negatív kontrollanyagokat kell használni, amelyeknél csak oldószert és vivőanyagot alkalmaznak a kezelt médiumban, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké. Ezenkívül nem kezelt kontrollanyagokat is fel kell használni, kivéve, ha léteznek olyan történeti kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy semmilyen ártalmas, mutagén hatást nem hoz létre a kiválasztott oldószer.

1.4.3. **A kísérlet végrehajtása**

1.4.3.1. *Kezelés a vizsgált anyaggal*

A proliferáló sejteket a vizsgált anyaggal kell kezelni valamilyen metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében és e nélkül. A limfociták kezelése a mitogén stimuláció után körülbelül 48 órával kezdődik.

1.4.3.2. Rendszerint két tenyészetet használnak minden egyes koncentrációnál és nagyon ajánlatos negatív (oldószer) kontrolltenyészetek használata. Ahol a történeti adatokból minimális eltérés mutatható ki a két tenyészet között (13), (14), elfogadható egyetlen tenyészet használata minden egyes koncentrációnál.

A gázokat vagy illékony anyagokat megfelelő módszerekkel, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben kell vizsgálni (15) (16).

1.4.3.3. *Tenyészetbegyűjtési idő*

Az első kísérletben a sejteket 3-6 órára kell kitenni a vizsgált anyag hatásának, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül, a kezelés kezdete után körülbelül 1,5 normál sejtciklusidő letelte után kezdődik a feldolgozás (12). Ha e módszer negatív eredményeket ad mind metabolikus aktiválással, mind anélkül, végre kell hajtani egy további kísérletet aktiválás nélkül, folyamatos kezeléssel körülbelül az 1,5 normál sejtciklusidőtartammal egyenlő idő letelte után végrehajtott mintavételig. Bizonyos kémiai anyagok lehet, hogy könnyebben észlelhetők 1,5 ciklusnál hosszabb kezelési/mintavételi idő alkalmazása esetén. A metabolikus aktiválással kapott negatív eredményeket esetenkénti vizsgálattal kell megerősíteni. Azokban az esetekben, ahol a negatív eredmények megerősítését nem tekintjük szükségesnek, közljük ennek indokait.

1.4.3.4. *Kromoszóma-preparálás*

A sejttenyészeteket rendszerint 1-3 órán át kezelni kell Colcemid® – dal vagy kolchicinnel begyűjtésük előtt. Minden sejttenyészetet külön kell begyűjteni és feldolgozni a kromoszómák preparálásához. A kromoszóma-preparáció a sejtek hipotonikus oldattal való kezelését, fixálását és megfestését foglalja magában.

1.4.3.5. *Elemzés*

Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollanyagokét is ideértve, önálló kódolással kell ellátni a mikroszkópos elemzés előtt. Mivel a fixálási eljárások gyakran a metafázisban lévő sejtek egy részének széttörését eredményezik, mely kromoszóma-veszteséggel jár, ezért a kiértékelt sejtek tartalmaznak egy centromer számot, amely minden sejttípus esetében megfelel a ± 2 modális értéknek. Legalább 200, jól kiterült metafázist kell értékelni koncentrációnként és kontrollanyagonként, egyenlő arányban elosztva a megkettőzött minták között. E szám csökkenthető, amikor nagyszámú rendellenesség figyelhető meg.

Bár a vizsgálat célja a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek észlelése, fontos a poliploidok és az endoreduplikáció feljegyzése is, amennyiben ezek láthatók.

## 2. ADATOK

### 2.1. EREDMÉNYEK MEGÁLLAPÍTÁSA

A kísérleti egység a sejt, ebből következően meg kell állapítani a szerkezeti kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejtek arányát. Fel kell sorolni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek különböző típusait arányaikkal és gyakoriságukkal együtt, kísérleti és kontrolltenyészetenként. A gap külön kerül feljegyzésre és szerepel a jelentésben, de rendszerint azokat nem kell beleszámolni a rendellenességek összgyakoriságba.

A rendellenességek megállapítására irányuló fő kísérletekben egyidejűleg minden kezelt és negatív kontrolltenyészet esetében fel kell jegyezni a citotoxicitás meghatározására irányuló tevékenységeket.

Az egyes tenyészetekhez tartozó adatokat meg kell adni. Ezenkívül minden adatot táblázat formájában kell összefoglalni.

Nem követelmény az egyértelműen pozitív reakció igazolása. A nem egyértelmű eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, amelyhez lehetőleg módosítani kell a kísérleti körülményeket. A negatív eredmények megerősítésének szükségességét az 1.4.3.3. tárgyalja. Az ellenőrző (utólagos) kísérleteknél mérlegelni kell a vizsgálati paraméterek módosítását a kiértékelt feltételek tartományának kiterjesztésére. A módosítható vizsgálati paraméterek, többek között, a koncentrációk felosztása és a metabolikus aktiválási körülmények.

### 2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Több különböző kritérium létezik valamely pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek számának koncentrációval összefüggő vagy reprodukálható növekedése. Először az eredmények biológiai jelentőségét kell fontolóra venni. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (3) (13). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező.

A poliploid sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag potenciálisan gátolhatja a mitiotikus folyamatokat és számos kromoszóma-rendellenességet idézhet elő. Az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag potenciálisan gátolhatja a sejtciklus végbemenetelét (17), (18).

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételik meg a kísérletet.

Az *in vitro* kromoszóma-rendellenesség vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált anyag szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket idéz elő emlős szomatikus sejtek tenyészetében. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények mellett a vizsgált anyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket emlős szomatikus sejtek tenyészetében.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

– az oldószer kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

– sejtek típusa és eredete,

– a felhasznált sejttípus kariotípus jellemzői és alkalmassága,

– mikoplazma hiánya, ha előfordul ilyen,

– a sejtciklus hosszúságára vonatkozó információ,

– vérdonorok neme, teljes vér vagy elkülönített limfociták, használt mitogén,

– passzálások száma, ha vannak ilyenek,

– a sejttenyészet fenntartásának módszerei, ha vannak ilyenek,

– modális kromoszómaszám.

Vizsgálati körülmények:

– metafázis-blokkoló szer meghatározása, annak koncentrációja és behatásának időtartama,

– koncentrációk és tenyészetek száma kiválasztásának indoklása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és oldékonysági határokat, ha rendelkezésre állnak,

– tápfolyadék összetétele, $CO_2$ koncentráció, ha van ilyen,

– a vizsgált anyag koncentrációja,

– a vivőanyag és a hozzáadott vizsgált anyag térfogata,

– inkubációs hőmérséklet,

– inkubációs idő,

– kezelés időtartama,

– sejtsszám a leültetéskor, az adott esettől függően,

– metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, az elfogadhatósági kritériumot is ideértve,

– pozitív és negatív kontrollanyagok,

– tárgylemez preparálásának módszerei,

– rendellenességek értékelésének kritériumai,

– elemzett metafázisok száma,

– a toxicitás meghatározásához használt módszerek

– kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e,

Eredmények:

– toxicitás jelei, például konfluencia mértéke, sejtciklus adatok, sejtszámok, mitiotikus index,

– kicsapódás jelei,

– a kezelt médium pH-jával és ozmolalitásával kapcsolatos adatok, ha meghatároztuk azokat,

– rendellenességek (gap-et is beleértve) meghatározása,

– kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek száma és a kromoszóma-rendellenességek típusa, minden egyes kezelt és kontrolltenyészethez külön megadva,

– ploidok megfigyelt változásai,

– dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

– statisztikai elemzés, ha van ilyen,

– párhuzamos negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok,

– történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, átlagokkal és standard eltérésekkel.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **SZAKIRODALOM**

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

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

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., 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., 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 1245-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 Airbone 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"

*4. B. MELLÉKLET*

## „B.11. MUTAGENITÁS – KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VIVO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

### 1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 475-nek, kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálata emlősökön (1997).

### 1.1. BEVEZETÉS

A kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálatot állatok, rendszerint rágcsálók, csontvelősejtjeiben a vizsgált anyag által előidézett szerkezeti kromoszóma-rendellenességek észlelésére használjuk (1), (2), (3), (4). A szerkezeti kromoszóma-rendellenességek kétféle típusúak lehetnek, kromoszóma vagy kromatid. A poliploida gyakoriságának növekedése bizonyíték lehet arra, hogy valamely kémiai anyag számos rendellenességet idézhet elő. A mutációit előidéző kémiai anyagok többsége esetében az előidézett rendellenességek kromatid típusúak, de kromoszóma típusú rendellenességek is előfordulnak. A kromoszóma mutációk és ehhez hasonló folyamatok számos emberi genetikai betegségek okai. Néhány érv a mellett szól, hogy a kromoszóma-mutációk és ehhez hasonló folyamatok, amelyek változásokat okoznak az onkogénekben és a tumor szuppresszor génekben, szerepet játszanak az emberekben és a kísérleti rendszerekben a rák kialakulásában és megszűnésében.

E vizsgálatban rendszerint rágcsálókat kell használni. A csontvelő a vizsgált fő szövet, mivel ez gazdagon vaszkularizált, és olyan gyorsan szaporodó sejtek populációját tartalmazza, amelyek könnyen izolálhatók és preparálhatók. Más kísérleti állatok és célszövetek nem képezik e módszer tárgyát.

E kromoszóma-rendellenesség vizsgálat különösen alkalmas a releváns mutagén tulajdonságok értékelésére annyiban, hogy lehetővé teszi az *in vivo* metabolizmus, farmakokinetika és DNS-reparációs folyamatok tényezőinek vizsgálatát, bár ezek különbözőek az egyes fajok és különböző szövetek tekintetében. Az *in vivo* vizsgálat a valamely *in vitro* vizsgálat által észlelt, mutagén hatás további vizsgálatához is hasznos.

Ha bizonyos jelek utalnak arra, hogy a vizsgált anyag, vagy valamely reaktív metabolitja nem éri el a célszövetet, akkor e vizsgálat nem megfelelő.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

### 1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Kromatid típusú rendellenesség:** szerkezeti kromoszóma-károsodás, amely egy kromatid törésében vagy kromatidok közötti törésben és újraegyesítésben nyilvánul meg.

**Kromoszóma típusú rendellenesség:** szerkezeti kromoszóma-károsodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

**Endoreduplikáció:** az a folyamat, amely során valamely DNS replikációt követően a sejtmag nem lép be a mitózis fázisába, hanem egy másik S fázist indít. Az eredmény 4, 8, 16,… kromatiddal rendelkező kromoszómák.

**Gap:** egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus sérülés.

**Számszerű rendellenesség:** a kromoszómák számának eltérése a felhasznált sejteket jellemző normál számértéktől.

**Poliploida:** a haploid kromoszómaszám (n) egészszámú, de nem diploid (azaz 3n, 4n, és így tovább) megsokszorosódása.

**Szerkezeti rendellenesség:** a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében, mint a delíciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződés.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az állatoknak a vizsgált anyagot a megfelelő módon kell adagolni, majd a kezelés után megfelelő időpontokban el kell pusztítani azokat. Az elpusztítás előtt az állatokat metafázis-blokkoló szerrel (például kolchicin vagy Colcemid®) kell kezelni. Ezután kromoszóma készítményeket kell létrehozni a csontvelősejtekből és megfesteni azokat, majd elemezni kell a metafázisú sejteket kromoszóma-rendellenességek megállapítása céljából.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Rendszerint patkányokat, egereket és kínai hörcsögöket kell használni, jóllehet bármilyen megfelelő emlős használata lehetséges. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell használni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a relatív páratartalom értékének 50-60 % között kell lennie.

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba osztják. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek az elhelyezés miatti esetleges hatások. Ezt követően az állatokat egyenként azonosítják. Az állatokat legalább öt napig szoktatják a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. *Dózisok előkészítése*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani az összeegyeztethetőségüket bizonyító adatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

1.4.2.2. *Kontrollok*

Mindkét nemhez és minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokat alkalmaznak. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrolloknak *in vivo* szerkezeti rendellenességeket kell létrehozni expozíciós koncentrációban úgy, hogy észlelhető legyen a növekedés (a háttérhez viszonyítva). A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választják ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. Elfogadható, hogy a pozitív kontroll beadása a vizsgált anyag beadási módjától eltérjen, és

hogy csak egyetlen mintavételre kerüljön sor. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

| Anyag | CAS szám | EINECS szám |
|---|---|---|
| Etil-metán-szulfonát | 62–50–0 | 200–536–7 |
| N-etil-N-nitrozo-karbamid | 759–73–9 | 212–072–2 |
| Mitomicin C | 50–07–7 | 200–008–6 |
| Ciklofoszfamid | 50–18–0 | 200–015–4 |
| Ciklofoszfamid monohidrát | 6055–19–2 | |
| Trietilén-melamin | 51–18–3 | 200–083–5 |

Minden mintavétel alkalmával a negatív kontrollcsoportban lévő állatokat is figyelembe kell venni, amelyeknek csupán oldószert adagolunk, egyébként azonos bánásmódban részesítjük azokat a kezelt állatokkal, kivéve ha a történeti kontrolladatokból elfogadható értékek állnak rendelkezésre a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek állaton belüli sokfélesége és gyakorisága tekintetében. Ha a negatív kontrolloknál csak egyetlen mintavételezést kell alkalmazni, ennek legmegfelelőbb ideje az első mintavételi idő. Ezenkívül használnak nem kezelt kontrollállatokat, kivéve ha vannak olyan történeti vagy nyilvánosságra hozott kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy a kiválasztott oldószer/vivőanyag semmilyen ártalmas vagy mutagén hatást nem hoz létre.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Állatok száma és neme**

Minden egyes kezelt és kontrollcsoport nemenként legalább öt elemezhető állatot tartalmaz. Ha a tanulmány végrehajtásakor rendelkezésre állnak olyan adatok azonos fajták és azonos expozíciós mód használata mellett, amelyek azt mutatják, hogy nincsenek jelentős különbségek a nemek között a toxicitás tekintetében, elegendő lesz egyetlen nem vizsgálata. Ahol az emberek esetében az expozíció nemre jellemző lehet, mint például néhány gyógyszeranyag esetében, a vizsgálatot a megfelelő nemű állatokkal kell elvégezni.

1.5.2. **Kezelés lefolytatása**

A vizsgált anyagot lehetőleg egyetlen alkalommal adják be. A vizsgált anyagot két adagban is be lehet adni, ugyanazon a napon két alkalommal néhány órás időközzel, nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítésére. Más adagolási módok alkalmazását tudományosan indokolni kell.

Ha a vizsgált anyagot ugyanazon napon adják be, mintákat két különböző időpontban kell venni. Rágcsálók esetében az első mintavétel a kezelést követő 1,5 normál sejtciklusidő letelte után történik (az utóbbi rendszerint 12-18 óra között van). Mivel a vizsgált anyag felvételéhez és anyagcseréjéhez, valamint ennek a sejtciklus kinetikára gyakorolt hatásának a bekövetkeztéhez szükséges idő befolyásolhatja a kromoszóma-rendellenesség észlelésének optimális időpontját, ezért ajánlott az első mintavétel után 24 órával ismételten mintát venni. Ha olyan adagolási módszert választanak, ahol nem egyetlen nap adagolják a vizsgált anyagot, akkor a mintavételt, az utolsó kezelés után 1,5 normál sejtciklus-idő elteltekor kell elvégezni.

Az állatok elpusztítása előtt a hasüregébe adott injekcióval megfelelő adag metafázis blokkoló szert (például Colcemid$^{O}$ vagy kolchicin) fecskendeznek be. Ezután az állatokból mintákat kell venni megfelelő időközönként. Egerek esetében ez az időköz körülbelül 3-5 óra; kínai hörcsögök esetében körülbelül 4-5 óra. A sejteket ki kell nyerni a csontvelőből, majd elemezni kell azokat a kromoszóma-rendellenességek megállapítása céljából.

1.5.3. **Dózisok**

Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeznek, mert nem állnak rendelkezésre alkalmas adatok, ezt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajták, törzsek, nemek és kezelési eljárás alkalmazásával hajtják végre, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmaznak (5). Ha észlelhető toxicitás, akkor három dózist használnak az első mintavételhez. E dózisoknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételnél csak a legmagasabb dózist kell használni. A legmagasabb adag az a dózis, ami olyan egyértelmű toxicitás jeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének) adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. A legmagasabb adag olyan dózisként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jeleket a csontvelőben (például 50 %-nál nagyobb csökkenést a mitiotikus indexben).

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúly dózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatásokat nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat. Hosszabb időtartamú vizsgálatok esetében a határadag 2 000 mg/kg/testsúly/nap legfeljebb 14 napos kezelés, és 1 000 mg/kg/testsúly/nap 14 napnál hosszabb kezelés esetében. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át, inkubációs kanül segítségével vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/100g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. Magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

1.5.6. **Kromoszóma-preparáció**

Közvetlenül az elpusztítás után csontvelőt kell venni, és hipotoniás oldatba tenni, majd fixálni. A sejteket ezután tárgylemezekre kell teríteni és megfesteni.

1.5.7. **Elemzés**

Meg kell határozni a mitiotikus indexet a citotoxicitás megállapításához állatonként legalább 1 000 sejtben, minden kezelt állat (pozitív kontrollállatokat is ideértve) és nem kezelt, negatív kontrollcsoportba beosztott állat esetében.

Legalább 100 metafázist kell elemezni minden egyes állatnál. Ez a szám csökkenthető amennyiben nagyszámú rendellenességet figyelnek meg. Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollokat is ideértve, egymástól függetlenül kezelni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Mivel a fixálási eljárások gyakran a metafázisban lévő sejtek egy részének széttörését eredményezik, mely kromoszóma-veszteséggel jár, ezért a kiértékelt sejtek tartalmaznak egy centromer számot, amely megfelel a 2n± 2 értéknek.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK MEGÁLLAPÍTÁSA

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. A kísérleti egység maga az állat. Minden egyes állat esetében fel kell jegyezni az értékelt sejtek számát, a sejtenkénti rendellenességek számát és a szerkezeti kromoszóma-rendellenességget mutató sejtek arányát. Fel kell sorolni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek különböző típusait a számukkal és gyakoriságukkal együtt kezelt és kontrollcsoportonként. A gap külön kerül feljegyzésre és szerepel a jelentésben, de rendszerint azokat nem kell beleszámolni a rendellenességek összgyakoriságba. Ha semmilyen bizonyíték nincs arra, hogy eltérés van a két nem között a reakciók tekintetében, összevonhatók a nemekhez kapott adatok a statisztikai elemzés céljából.

2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek számának növekedése a dózis függvényében, vagy egyetlen mintavétel alkalmával egy meghatározott dózis mellett a rendellenességet mutató sejtek számának egyértelmű növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (6). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező. A többféleképpen magyarázható eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, lehetőleg a kísérleti körülményeket módosítva.

A poliploida gyakoriságának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag számos kromoszóma-rendellenességet idézhet elő. A reduplikáció növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag akadályozza a sejtciklus előrehaladást (7), (8).

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az *in vivo* kromoszóma-rendellenesség vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy valamely anyag kromoszóma-rendellenességeket idéz elő a vizsgált állatfajták csontvelőjében. Negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált körülmények mellett a vizsgált anyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket a kísérleti állatok csontvelőjében.

Értékeli kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e az általános keringési rendszerbe, illetve kifejezetten a célszövetbe (például szisztematikus toxicitás).

## 3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

– az oldószer kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

– használt fajok/törzs,

– állatok száma, kora és neme,

– az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

– az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagokat és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

– pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagok,

– a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

– a dózisok kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

– a vizsgált anyag beadására vonatkozó részletek,

– a beadási mód megindokolása,

– módszerek annak ellenőrzésére, hogy elérte-e a vizsgált anyag az általános keringési rendszert vagy célszövetet, ha vannak ilyenek,

– átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

– a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

– kezelési és mintavételi menetrend részletes leírása,

– toxicitás meghatározásának módszerei,

– metafázis-blokkoló szer meghatározása, annak koncentrációja és kezelés időtartama,

– tárgylemez preparálásának módszerei,

– rendellenességek értékelésének kritériumai,

– az elemzett sejtek száma (állatonként),

– azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

– toxicitás jelei,

– mitiotikus index,

– rendellenességek típusa és száma, minden egyes állat tekintetében külön megadva,

– csoportonként a rendellenességek össz-száma átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

– csoportonként a rendellenességeket mutató sejtek száma átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

– ploidok megfigyelt változásai,

– dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

– statisztikai elemzések, ha vannak,

– az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok,

– történeti negatív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

– az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

## 4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

(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 Vitro* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.,* 189, 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., MacGregor, 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., Alleen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK, Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis,* 7. pp. 313-319

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

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

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

*4. C. MELLÉKLET*

„B.12. **MUTAGENITÁS – *IN VIVO* EMLŐS ERITROCITA MIKRONUKLEUSZ VIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG 474-nek, emlős eritrocita mikronukleusz vizsgálat (1997).

1.1. BEVEZETÉS

Az emlős mikronukleusz *in vivo* vizsgálatot rendszerint rágcsálók csontvelőjéből és/vagy perifériás véréből vett mintákban az eritrociták elemzésével annak a károsodásnak az észlelésére használják, amelyet a vizsgált anyag idéz elő a kromoszómákban vagy az eritrociták mitiotikus rendszerében.

A mikronukleusz vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek olyan citogenetikai károsodást okoznak, amelyek eredménye visszamaradó kromoszóma töredékeket vagy egész kromoszómákat tartalmazó mikronukleuszok kialakulása.

Amikor a csontvelői eritroblasztból kifejlődik a polikromáziás eritrocita, a fő sejtmag kilökődik; minden, már létrejött mikronukleusz hátramaradhat a sejtmagmentes citoplazmában. E sejtekben a fő sejtmag hiánya miatt könnyebb a mikronukleusz láthatóvá tétele. A kezelt állatokban a mikronukleált polikromáziás eritrociták gyakoriságának növekedése az előidézett kromoszóma-károsodás jelzése.

E vizsgálatban általában rágcsálók csontvelőjét használják, mivel e szövetben termelődnek a polikromáziás eritrociták. A perifériás vérben lévő, mikronukleált polikromáziás eritrociták mérése is elfogadható minden olyan állatfajta esetében, amelynél már bebizonyosodott, hogy a lép képtelen eltávolítani a mikronukleált eritrocitákat vagy amelyek megfelelő érzékenységet mutattak a szerkezeti vagy számszerű kromoszóma-rendellenességeket okozó anyagok észlelésére. A mikronukleusz számos kritérium segítségével ismerhető fel. Ezek közé tartozik a mikronukleuszban egy kinetochor vagy a centromer DNS jelenlétének vagy hiányának megállapítása. A fő végcél a mikronukleusszal rendelkező polikromáziás eritrociták gyakoriságának meghatározása. A kiértékelés végcéljaként a perifériás vérben adott számú érett eritrocita közül azon normokromáziás eritrociták száma is használható, amelyek mikronukleuszt tartalmaznak, amikor az állatokat négy hétig vagy ennél hosszabb ideig kezelik.

Az *in vivo* emlős mikronukleusz vizsgálat különösen lényeges a mutagén veszély becslésében annyiban, hogy lehetővé teszi az *in vivo* metabolizmus, farmakokinetikai és DNS reparációs folyamatok tényezőinek vizsgálatát, bár ezek eltérőek lehetnek a különböző fajok, a különböző szövetek és a különböző genetikai végpontok között. Az *in vivo* kísérlet is hasznos a valamely *in vitro* rendszer által észlelt mutagén hatás további vizsgálatához.

Ha bizonyíték van arra, hogy a vizsgált anyag vagy egy reaktív metabolitja nem éri el a célszövetet, akkor nem megfelelő e vizsgálat.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Centroméra (Kinetokór):** valamely kromoszóma olyan régiója (régiói), amelyhez orsórostok kapcsolódnak a sejtosztódás során, lehetővé téve a leánykromoszómák szabályos mozgását a leánysejtek pólusaihoz.

**Mikronukleusz:** a sejtek fő magjától elkülönült kis járulékos mag, amelyet a mitózis (meiózis) telofázisa során hoznak létre visszamaradó kromoszóma töredékek vagy teljes kromoszómák.

**Normokromáziás eritrocita:** érett, riboszómákat már nem tartalmazó eritrocita, amely a riboszómákra szelektív festéssel különböztethető meg a polikromáziás eritrocitától.

**Polikromáziás eritrocita:** éretlen eritrocita, közbenső fejlődési szakaszban, amely még mindig tartalmaz riboszómákat, és ezért a riboszómákra szelektív festésekkel különböztethető meg az érett, normokromáziás eritrocitától.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot megfelelő módon kell az állatoknak adagolni. Csontvelő használatakor az állatokat a kezelés után, megfelelő időpontokban elpusztítják, a csontvelőt kivonják, preparálják, majd megfestik (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7). Perifériás vér használatakor a vért a kezelés után megfelelő időpontokban össze kell gyűjteni és kenetpreparátumokat kell létrehozni, majd meg kell festeni azokat (4), (8), (9), (10). Perifériás vérrel végrehajtott vizsgálatok esetén a lehető legkisebb időnek szabad csak eltelnie az utolsó expozíció és a sejtek összegyűjtése között. A preparátumokat elemezni kell a mikronukleusz jelenlétének megállapítása céljából.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Csontvelő használatakor egerek vagy patkányok javasoltak, jóllehet bármilyen megfelelő emlősfaj használható. Perifériás vér használatakor az egér az ajánlott kísérleti állat. Azonban bármilyen megfelelő emlősfaj használható, feltéve hogy az olyan faj, amelyben a lép nem távolítja el a mikronukleusszal rendelkező eritrocitákat, vagy olyan faj, amely megfelelő érzékenységet mutatott az olyan anyagok észlelésére, amelyek szerkezeti vagy számszerű kromoszóma-rendellenességeket okoznak. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat használunk. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól és a nemenkénti átlagos értéktől legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a relatív páratartalom értékének 50-60 % között kell lennie.

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba kell osztani. Az állatokat egyenként azonosítani kell. Az állatokat legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások.

1.4.1.4. *Adagok előkészítése*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/Vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitásukat bizonyító adatokkal.

1.4.2.2. *Kontrollanyagok*

Mindkét nemhez és minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív kontrollokat alkalmaznak. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrolloknak *in vivo* mikronukleuszokat kell létrehozniuk expozíciós koncentrációban úgy, hogy észlelhető legyen a növekedés (a háttérhez viszonyítva). A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. Elfogadható, hogy a pozitív kontrollanyag beadása a vizsgált anyag beadási módjától eltérő módon történjen, és hogy a mintavételezésre csak egyetlen időpontban kerüljön sor. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

| Anyag | CAS szám | Einecs szám |
|---|---|---|
| Etil-metán-szulfonát | 62–50–0 | 200–536–7 |
| N-etil-N-nitrozo-karbamid | 759–73–9 | 212–072–2 |
| Mitomicin C | 50–07–7 | 200–008–6 |
| Ciklofoszfamid<br>ciklofoszfamid monohidrát | 50–18–0<br>6055–19–2 | 200–015–4 |
| Trietilén-melamin | 51–18–3 | 200–083–5 |

Minden mintavétel alkalmával a negatív kontrollcsoportban lévő állatokat is figyelembe kell venni, amelyeknek csupán oldószert adagolnak, egyébként azonos bánásmódban kell részesíteni azokat a kezelt állatokkal, kivéve ha a történeti kontrolladatokból elfogadható értékek állnak rendelkezésre a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek állaton belüli sokfélesége és gyakorisága tekintetében. Ha a negatív kontrolloknál csak egyetlen mintavételezést alkalmaznak, ennek legmegfelelőbb ideje az első mintavételi idő. Ezenkívül használnak nem kezelt kontrollállatokat, kivéve ha vannak olyan történeti vagy nyilvánosságra hozott kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy a kiválasztott oldószer/vivőanyag semmilyen ártalmas vagy mutagén hatást nem hoz létre.

Perifériás vér használatakor előkezelt minta is elfogadható párhuzamos negatív kontrollként, de csak a rövid perifériás vérvizsgálatokban (például 1-3 adagos kezelés), amikor az ebből kapott adatok a történeti kontrollanyagok várt tartományban vannak.

## 1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

### 1.5.1. **Állatok száma és neme**

Minden egyes kezelt és kontrollcsoport nemenként legalább öt elemezhető állatot tartalmaz (11). Ha a tanulmány végrehajtásakor rendelkezésre állnak olyan adatok azonos fajták és azonos expozíciósmód használata mellett, amelyek azt mutatják, hogy nincsenek jelentős különbségek a nemek között a toxicitás tekintetében, elegendő lesz egyetlen nem vizsgálata. Ahol az emberek esetében az expozíció nemre jellemző lehet, mint például néhány gyógyszeranyag esetében, a vizsgálatot a megfelelő nemű állatokkal kell elvégezni.

### 1.5.2. **A kezelés lefolytatása**

Semmilyen standard kezelési menetrend (azaz egy, kettő vagy több kezelés 24 órás időközönként) nem javasolható. A hosszabb adagolás alkalmával véletlenszerűen vett minták mindaddig elfogadhatók, amíg bebizonyosodik annak pozitív hatása erre a vizsgálatra, vagy negatív vizsgálat esetében mindaddig, amíg bebizonyosodik, hogy létrejött toxicitás vagy a határadagot használtak, és az adagolás a mintavétel idejéig folytatódott. A vizsgált anyagot két adagban is be lehet adni, ugyanazon a napon két alkalommal néhány órás időközzel, a nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítésére.

A vizsgálat kétféle módon hajtható végre:

a) az állatokat egyszer kell kezelni a vizsgált anyaggal. Legalább kétszer kell csontvelőmintákat venni, a kezelés után 24 óránál nem korábban, de a kezelés utáni 48 órát nem meghaladó időpontban, a minták közötti megfelelő időközökkel. A kezelés utáni 24 óránál korábbi mintavételt meg kell indokolni. Legalább kétszer kell perifériás vérmintákat venni, a kezelés utáni 36 óránál nem korábban kezdve, az

első mintát követő megfelelő időközökkel, de 72 órát nem meghaladó időpontban. Ha valamely mintavétel alkalmával pozitív reakciót tapasztalunk, akkor nincs szükség további mintavételre;

b) ha naponként kettő vagy több alkalommal adagoljuk a vizsgált anyagot (például kettő vagy több kezelés 24 órás időközönként), egyszer kell mintákat gyűjteni az utolsó kezelést követő 18 és 24 óra között a csontvelő, és egyszer az utolsó kezelést követő 36 és 48 óra között a perifériás vér vizsgálata esetében (12).

Ezenkívül alkalmazhatók más mintavételi idők is, amikor ez az adott esetben megfelelő.

1.5.3. **Dózisok**

Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeztek, mert nem állnak rendelkezésre alkalmas adatok, ezt ugyanabban a laboratóriumban, ugyanazon fajták, törzs, nem és kezelési eljárás alkalmazásával hajtják végre, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmaznak (13). Ha észlelhető toxicitás, három dózist kell használni az első mintavételhez. E dózisoknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételnél csak a legmagasabb adagot használják. A legmagasabb adag az a dózis, amely olyan egyértelmű toxicitási jeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének) adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. A legmagasabb adag olyan adagként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jeleket (például a csontvelőben vagy a perifériás vérben az összes eritrocita között az éretlen eritrociták arányának csökkenése).

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúly dózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatásokat nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat. Hosszabb időtartamú vizsgálatok esetében a határadag 2 000 mg/kg/testsúly/nap legfeljebb 14 napos kezelés, és 1 000 mg/kg/testsúly/nap 14 napnál hosszabb kezelés esetében. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/100g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

1.5.6. **Csontvelő/vér preparálása**

A csontvelősejteket rendszerint a femurokból vagy tibiákból kell venni közvetlenül az állatok elpusztítása után. A sejteket el kell távolítani a combcsontokból vagy sípcsontokból, preparálni kell azokat és megfesteni már ismert módszerek segítségével. A perifériás vért a farokvénából vagy más megfelelő érből kell venni. A vérsejteket azonnal, szupravitálisan meg kell festeni (8) (9) (10) vagy kenetpreparátumokat kell létrehozni, és ezután kell elvégezni a festést. A DNS-specifikus festékek (például akridinnarancs (14) vagy Hoechst 33258 plusz pironin-Y (15)) használata kiküszöbölhet néhányat a DNS-re nem jellemző festőanyag használatával mesterségesen előidézett változás közül. Ez az előny nem zárja eleve ki a hagyományos festékek (például Giemsa) használatát. További rendszerek (például cellulózoszlopok a magvas sejtek eltávolítására (16)) is használhatók, feltéve hogy már bebizonyosodott e rendszerekről, hogy megfelelően működnek a laboratóriumban mikronukleált sejtek preparációjánál.

1.5.7. **Elemzés**

Minden egyes állatnál meg kell határozni az összes (éretlen + érett) eritrocitához viszonyítottan az éretlenek arányát, csontvelő esetében összesen legalább 200 eritrocita és perifériás vér esetében legalább 1 000 eritrocita megszámlálásával (17). Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollanyagokét is, kódolni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Állatonként legalább 2 000 éretlen mikronukleuszt kell kiértékelni a mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták előfordulásának megállapítása céljából. További információk

kaphatók az érett eritrociták értékelésével abból a szempontból, hogy tartalmaznak-e mikronukleuszt. A tárgylemezek elemzésekor az összes eritrocitát tekintve, az éretlen eritrociták arányának nem szabad a kontrollérték 20 %-ánál kisebbnek lennie. Amikor az állatokat folyamatosan kezeljük négy hétig vagy ennél hosszabb ideig, állatonként legalább 2 000 érett eritrocita is kiértékelhető a mikronukleusz jelenlétének megállapítása céljából. Automatizált elemző rendszerek (képanalizáló és áramlási citometria sejtszuszpenziókra) a kézi értékelés elfogadható alternatívái, ha alkalmazásuk megfelelően indokolt és e rendszerek érvényesítettek.

## 2. ADATOK

### 2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell összefoglalni. A kísérleti egység maga az állat. Minden egyes állat esetében külön kell feljegyezni a kiértékelt éretlen eritrociták számát, a mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták számát és az összes eritrociták közül az éretlenek számát. Amikor az állatokat folyamatosan négy hétig vagy ennél hosszabb ideig kezeljük, az érett eritrocitákra vonatkozó adatokat is meg kell adni, ha azok megállapításra kerültek. Minden egyes állat tekintetében meg kell adni az összes eritrociták között az éretlenek arányát és, adott esetben, a mikronukleusszal rendelkező eritrociták arányát. Ha semmilyen bizonyíték nincs arra, hogy eltérés van a két nem között a reakciók tekintetében, összevonhatók a nemekhez kapott adatok a statisztikai elemzés céljából.

### 2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a mikronukleusszal rendelkező sejtek számának növekedése a dózis függvényében vagy egyetlen mintavétel alkalmával egy meghatározott dózis mellett a mikronukleusszal rendelkező sejtek számának egyértelmű növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (18) (19). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező. A többféleképpen magyarázható eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, lehetőleg a kísérleti körülményeket módosítva.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak, tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismétlik meg a kísérletet.

A mikronukleusz vizsgálat pozitív eredményei azt jelzik, hogy a vizsgált anyag létrehoz olyan mikronukleuszt, amely a vizsgált fajok eritrocitáiban a mitiotikus rendszer károsodásának vagy kromoszómakárosodásnak az eredménye. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem indukál mikronukleuszokat a vizsgált fajok éretlen eritrocitáiban.

Értékelni kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e az általános keringési rendszerbe ill. kifejezetten a célszövetbe (például szisztematikus toxicitás).

## 3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

– az oldószer kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

– használt fajok/törzs,

– állatok száma, kora és neme,

– az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

– az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagértéket és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

– pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagok,

– a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

– a dózisok kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

– a vizsgált anyag beadására vonatkozó részletek,

– a beadási mód megindoklása,

– módszerek annak ellenőrzésére, hogy elérte-e a vizsgált anyag az általános keringési rendszert vagy célszövetet, ha vannak ilyenek,

– átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

– a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

– kezelési és mintavételi menetrendek részletes leírása,

– a tárgylemez preparálásának módszerei,

– toxicitás mérésének módszerei,

– mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták értékelésének kritériumai,

– az elemzett sejtek száma (állatonként),

– azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

– toxicitás jelei,

– éretlen eritrociták aránya az összes eritrocitához képest,

– mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták száma, minden egyes állat tekintetében külön megadva,

– csoportonként a mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták átlagértéke ± standard eltérés,

– dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

– statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek,

– az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok és történeti negatív adatok,

– az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **SZAKIRODALOM**

(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., Pcchicrotti, 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 Sotou, 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 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

(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 Recommendes Procedures, UKEMS Subcommittee 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), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Subcommittee 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"

*4. D. MELLÉKLET*

## „B.13/14. MUTAGENITÁS – REVERZ MUTAGENITÁSI VIZSGÁLAT BAKTÉRIUMOKKAL

### 1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 471-nek, reverz mutagenitási vizsgálat baktériumokkal (1997).

### 1.1. BEVEZETÉS

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat a *Salmonella typhimurium* és *Escherichia coli* aminosavat igénylő törzseit használja pontmutációk észlelésére, amelyek magukban foglalják egy vagy néhány DNS bázispár szubsztitúcióját, addícióját vagy delécióját (1), (2), (3). E bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatnak az az elve, hogy észleli azon mutációkat, amelyek revertálják a kísérleti törzsekben jelen lévő mutációkat, és helyreállítja a baktériumoknak egy esszenciális aminosavat szintetizáló képességét. A revertált baktérium észlelése azon képességének a segítségével történik, hogy az növekedni tud, amikor nincs jelen a vizsgálati anyatörzs által igényelt aminosav.

A pontmutációk sok emberi genetikai betegség okozói, és számos bizonyíték van arra, hogy a testi sejtek onkogénjeinek és tumorszuppresszor génjeinek a pontmutációi szerepet játszanak a daganat képződésben emberekben és kísérleti állatokban. A reverz mutáció vizsgálatot baktériumokkal gyors, olcsó és viszonylag könnyű végrehajtani. E törzsek közül sok törzs rendelkezik néhány olyan jellemzővel, amelyek érzékenyebbekké teszik azokat mutációk észleléséhez; ilyenek a reverzió helyének DNS szekvenciája, nagyobb molekulák iránti fokozott sejt-permeabilitás, bizonyos DNS reparációs rendszerek kiiktatása, vagy a hibára hajlamos DNS reparációs folyamatok serkentése. A kísérleti törzsek sajátossága néhány hasznos információt szolgáltathat a genotoxikus anyagok által előidézett mutációk típusairól. Szerkezetek sokféle változatához kapott eredmények bő adatbázisa áll rendelkezésre baktériális reverz mutagenitás vizsgálatokhoz; jól megalapozott metodikákat fejlesztettek ki különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező kémiai anyagok, beleértve az illékony vegyületeket is, vizsgálatához.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

### 1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**A reverz mutagenitás vizsgálat** vagy *Salmonella typhimurium*-mal vagy *Escherichia coli*-val elvégezve, azon mutációkat igazolja, amelyek valamely aminosavat (hisztidin, illetve triptofán) igénylő törzsben lépnek fel és egy olyan törzs kialakulásához vezetnek, ami a külső aminósav-ellátástól független.

**Bázispárcserét okozó mutagének** azok a hatóanyagok, amelyek alapvető bázisváltozást okoznak a DNS-ben. A reverziós vizsgálatban e változás az eredeti mutáció helyén vagy a baktérium genom egy másik helyén.

**Frameshift mutagének**azok a hatóanyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delécióját okozzák a DNS-ben, ezzel megváltoztatva a leolvasó keretet a ribonukleinsavban.

### 1.3. ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat prokarióta sejteket használ, amelyek az olyan tényezőkben térnek el az emlőssejtektől, mint például a kémiai anyagok felvétele, metabolizmus, kromoszóma szerkezet és DNS reparációs folyamatok. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint a metabolikus aktiválás valamilyen kívülről ható forrásának használatát teszik szükségessé. Az *in vitro* metabolikus aktiváló rendszerek nem tudják teljesen szimulálni az emlős *in vivo* körülményeket. Ebből következően a vizsgálat nem ad közvetlen tájékoztatást az emlősök esetében valamely anyag mutációt előidéző és daganatkeltő potenciáljáról.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatot rendszerint a genotoxikus aktivitás és különösen a pontmutáció-előidéző aktivitás első szűrőjeként alkalmazzák. A terjedelmes adatbázis bebizonyította, hogy sok olyan kémiai anyag, amely e vizsgálatban pozitívnak bizonyult, más vizsgálatokban is mutagénnek bizonyul. Léteznek példák olyan mutációt előidéző hatóanyagokra, amelyeket nem észlel e vizsgálat; e hiányosságok okai a vizsgált végpont különleges természetének, a metabolikus aktiválásban előforduló

különbségeknek, vagy a biológiai elérhetőségben lévő különbségeknek tulajdoníthatók. Másrészről, azon tényezők, amelyek növelik a bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat érzékenységét, a mutagén aktivitás túlbecsléséhez vezethetnek.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat lehet, hogy nem bizonyul megfelelőnek bizonyos kémiai anyagosztályok értékeléséhez, ilyenek például az erősen baktericid vegyületek (például bizonyos antibiotikumok) és azok, amelyek vélhetően (vagy bizonyítottan) kifejezetten zavaró hatással vannak az emlőssejt replikációs rendszerére (például néhány topoizomeráz gátló szer és néhány nukleozid analóg). Ilyen esetekben megfelelőbbnek bizonyulhatnak az emlős mutagenitási vizsgálatok.

Sok olyan vegyület van, amely pozitív eredményt mutat e vizsgálatban és az emlősökben rákkeltő, a korreláció mégsem abszolút. Mérvadó a kémiai anyag osztálya, és léteznek olyan karcinogén anyagok, amelyeket nem észlel e vizsgálat, mivel azok más, nem genotoxikus mechanizmusokon, vagy olyan mechanizmusokon keresztül fejtik ki a hatásukat, amelyek nincsenek jelen baktériumokban.

## 1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Baktériumsejtek szuszpenzióit kezelik a vizsgált anyaggal exogén metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében és anélkül. A lemezöntéses (plate incorporation) módszernél e szuszpenziókat közvetlenül be kell keverni a felülöntő agarba, és minimális táptalajra helyezni. Az előinkubációs módszer esetében az expozíciós keveréket inkubálni kell, és csak ezután kell azt bekeverni a felülöntő agarba a minimál táptalajra helyezés előtt. Mindkét módszer alkalmazásakor két vagy három napig tartó inkubálás után meg kell számolni a revertáns telepeket, és össze kell hasonlítani azt az oldószer kontroll-lemeztenyészeteken lévő spontán revertáns telepek számával.

Már több különböző eljárást írtak le a bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat végrehajtására. A leggyakrabban használt eljárások közé tartoznak a lemezöntéses módszer (1), (2), (3), (4) az előinkubációs módszer (2), (3), (5), (6), (7), (8) a fluktuációs módszer (9), (10) és a szuszpenziós módszer (11). Már leírtak módosított változatokat gázok vagy gőzök vizsgálatához (12).

A módszerben leírt eljárások elsősorban a lemezöntéses és az előinkubációs módszerekhez tartoznak. Ezek közül bármelyik alkalmas kísérletek végrehajtására, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Néhány anyag hatékonyabban észlelhető az előinkubációs módszer segítségével. Ezen anyagok olyan kémiai anyagosztályokhoz tartoznak, amelyek rövid szénláncú alifás nitrozaminokat, kétvegyértékű fémeket, aldehideket, azo festékeket és diazo-vegyületeket, pirrlizidin alkaloidokat, allil és nitrovegyületeket tartalmaznak (3). Azt is felismerték, hogy a mutagének bizonyos osztályai nem mindig észlelhetők az olyan szokásos eljárásokkal, mint például a lemezöntéses vagy előinkubációs módszer. Ezeket »különleges eseteknek« kell tekinteni és észlelésükre alternatív eljárásokat kell használni. A következő »különleges esetek« azonosíthatók (az észlelésükhöz használható eljárásokra adott példákkal együtt): azo festékek és diazo-vegyületek (3), (5), (6), (13) gázok és illékony kémiai anyagok (12), (14), (15), (16) és glikozidok (17), (18). A standard eljárástól való eltérést tudományosan meg kell indokolni.

## 1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

### 1.5.1. **Előkészületek**

#### 1.5.1.1. *Baktériumok*

Friss baktériumtenyészeteket kell létrehozni a tenyésztés késői logaritmikus vagy korai stacioner fázisáig (körülbelül $10^9$ sejt/ml). Késői stacioner fázisban lévő tenyészeteket nem szabad használni. Lényeges, hogy a kísérletben használt tenyészetek nagy arányban tartalmazzanak életképes baktériumokat. Ezt az arányt vagy történeti kontrolladatokból, vagy minden egyes vizsgálatban külön kiszélesztéssel az életképes sejtek számának meghatározásával lehet megadni.

A javasolt inkubációs hőmérséklet 37 °C.

Legalább öt baktériumtörzset kell használni. Ezek közül négy törzs az *S. typhinuriumhoz* (TA 1535; TA 1537 vagy TA97a vagy TA97; TA98; és TA100) tartozik, amelyekről már bebizonyosodott, hogy megbízhatóan és reprodukálhatóan reagálnak a különböző laboratóriumokban. E négy *S. typhimurium* törzsnek GC bázispárjai vannak a primer reverziós helyen, és ismert, hogy esetleg nem mutatnak ki bizonyos oxidatív mutagéneket, keresztkötő ágenseket és hidrazinokat. Az ilyen anyagok *E. coli* WP2 törzsekkel vagy *S. typhimurium* TA102-vel (19) észlelhetők, amelyek egy AT bázispárral rendelkeznek a primer reverziós helyen. Ezért tehát a következő törzsek kombinációja javasolt:

– *S. typhimurium* TA1535, és

– *S. typhimurium* TA1537 vagy TA97 vagy TA97a, és

– *S. typhimurium* TA98, és

– *S. typhimurium* TA100, és

– *E. coli* WP2 uvrA, vagy *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), vagy *S. typhimurium* TA102.

A keresztkötő mutagének észleléséhez előnyben részesíthető a TA102 használata, vagy az *E. coli*-nak egy DNS reparációban kiválónak bizonyuló törzse (ilyen például az *E. coli* WP2 vagy *E. coli* WP2 (pKM101)) alkalmazása.

A törzstenyészet elkészítéséhez, az indikátor ellenőrzéséhez és tárolásához elfogadott eljárásokat kell használni. Minden fagyasztott törzstenyészet-készítmény esetében igazolni kell a tenyésztéshez szükséges aminosavat (hisztidin *S. typhimurium* törzsek és triptofán *E. coli* törzsek esetében). Más fenotipus-jellemzőket hasonlóképpen kell ellenőrizni, nevezetesen: R-faktor plazmidok jelenlétét vagy hiányát, ahol szükséges (azaz ampicillin rezisztenciát TA98, TA100 és TA97a vagy TA97, WP2 uvrA és WP2 uvrA (pKM101) törzsekben és amplicin plusz tetraciklin rezisztenciát TA102-es törzsben); a specifikus mutációk jelenléte (azaz rfa mutáció *S. typhimurium*-ban kristályibolyára való érzékenységen keresztül és uvrA mutáció *E. coli*-ban vagy uvrB mutáció *S. typhimurium*-ban, ibolyántúli fényre való érzékenységen keresztül) (2), (3). A törzseknek a laboratórium történeti kontrolladataiból várt gyakoriságtartományokon belüli és lehetőleg a szakirodalomban közölt tartományon belüli spontán revertáns telep lemeztenyésztési számokat is kell adniuk.

1.5.1.2. *Táptalaj*

Megfelelő minimál agart (például Vogel-Bonner minimál E ingredienseket és glukózt tartalmazót) és hisztidint, biotint vagy tiptofánt tartalmazó felülöntő agart alkalmazunk, azért hogy több sejtosztódást lehessen megfigyelni (1), (2), (9).

1.5.1.3. *Metabolikus aktiválás*

A baktériumot kezelni kell a vizsgált anyaggal, mind megfelelő metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében, mind anélkül. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorral kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amelyet enziminducerrel, ilyen például az Aroclor 1254 (1), (2), vagy a fenobarbiturát és ß-naftoflavon (18), (20), (21) kombinációjával kezelt rágcsálók májából készítették. A poszt-mitokondriális frakciót rendszerint 5-től 30 térfogatszázalékig terjedő koncentrációkban használják az S9-keverékben. Valamely metabolikus aktiváló rendszer kiválasztása és állapota függhet a vizsgálatra kerülő kémiai anyag osztályától. Meghatározott esetekben megfelelőnek bizonyulhat a poszt-mitokondriális felülúszás egynél több koncentrációjának használata. Azofestékek és diazo-vegyületek esetében megfelelőbbnek bizonyulhat valamilyen redukciós metabolikus aktiváló rendszer használata (6) (13).

1.5.1.4. *Vizsgált anyag/előkészítés*

A szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben, vagy ha szükséges hígítani kell a baktérium kezelése előtt. A folyékony vizsgált anyagokat közvetlenül hozzá lehet adni a vizsgált rendszerekhez és/vagy hígíthatók kezelés előtt. Friss készítményeket kell használni, kivéve ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát jelzik.

Oldószerként nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal, és kompatibilisnek kell lennie a baktérium túlélésével és az S9-es aktivitással (22). Ha a jól ismert oldószertől eltérő oldószereket használnak, ezek használatát alá kell támasztania az összeegyeztethetőségüket jelző adatokkal. Elsőként valamilyen vizes oldószer használatát kell megfontolni. Vízzel instabil anyagok vizsgálatakor a használt szerves oldószereknek vízmenteseknek kell lenniük.

1.5.2. **Vizsgálati körülmények**

1.5.2.1. *Vizsgált törzsek* (lásd az 1.5.1.1. alatt)

1.5.2.2. *Expozíciós koncentráció*

A vizsgált anyag legnagyobb koncentrációjának meghatározásakor figyelembe veendő kritériumok közé tartozik többek között a citotoxicitás és az oldékonyság a végső keverékben.

Hasznosnak bizonyulhat a toxicitás és az oldékonyság meghatározása egy előzetes kísérletben. A citotoxicitás a revertáns telepek számának csökkenésével, a háttér táptalaj kitisztulásának vagy csökkenésének, vagy a kezelt tenyészetek túlélési rátájának segítségével észlelhető. Valamely anyag citotoxicitása valószínűleg megváltozik metabolikus aktiváló rendszerek jelenlétében. Az oldhatatlanságot a végső keverékben a tényleges vizsgálati körülmények között szabad szemmel látható csapadék képződéseként lehet felismerni.

Oldható, nem citotoxikus anyagok esetében a javasolt maximális kísérleti koncentráció 5 mg/lemez vagy 5 µl/lemez. Az 5 mg/lemeznél vagy 5 µl/lemeznél nem oldódó, nem citotoxikus anyagok esetében egy vagy több kísérleti koncentrációnak nem oldódónak kell lennie a végső keverékben. Azon vizsgált anyagokat, amelyek már 5 mg/lemez vagy 5 µl/lemez alkalmazása esetén citotoxikusak, egészen a citotoxikus koncentrációig kell vizsgálni. A kicsapódás nem zavarhatja az értékelést.

A vizsgált anyag legalább öt különböző elemezhető koncentrációját használják körülbelül fél log-fázis (azaz $\sqrt{10}$) intervallumokkal az első kísérletben. Megfelelőek lehetnek ennél kisebb intervallumok valamilyen koncentráció-hatás viszony vizsgálatakor. Megfontolható 5 mg/lemez, vagy 5 µl/lemez koncentrációt meghaladó vizsgálat jelentős mennyiségű potenciálisan mutagén szennyeződéseket tartalmazó anyagok értékelésekor.

1.5.2.3. **Negatív és pozitív kontrollok**

Minden egyes vizsgálatban egyidejűleg, törzsre jellemző pozitív és negatív (oldószer) kontrollanyagokat alkalmaznak, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Olyan pozitív kontrollanyag koncentrációkat kell kiválasztani, amelyek bizonyítják az egyes vizsgálatok hatékonyságát.

Metabolikus aktiváló rendszert alkalmazó vizsgálatok esetében a pozitív kontroll referenciaanyagot (anyagokat) a használt baktériumtörzsek típusa alapján kell kiválasztani.

A következő anyagok példaként szolgálnak a metabolikus aktiválással végrehajtott vizsgálathoz alkalmas pozitív kontrollanyagokra:

| Anyag | CAS szám | Einecs szám |
|---|---|---|
| 9,10-Dimetil-antracén | 781-43-1 | 212-308-4 |
| 7,12-Dimetilbenz[a]antracén | 57-97-6 | 200-359-5 |
| Benzo[a]pirén | 50-32-8 | 200-028-5 |
| 2-Amino-antracén | 613-13-8 | 210-330-9 |
| Ciklofoszfamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| Ciklofoszfamid monohidrát | 6055-19-2 | |

A következő anyag alkalmas pozitív kontrollanyag reduktív metabolikus aktiváló módszerhez:

| Anyag | CAS szám | Einecs szám |
|---|---|---|
| Kongóvörös | 573-58-0 | 209-358-4 |

A 2-Amino-antracént nem szabad használni az S9-es keverék hatékonyságának egyetlen indikátoraként. Ha használunk 2-Amino-antracént, akkor az S9 minden egyes adagját egy olyan mutagénnel is jellemezni kell, amely mikroszómális enzimekkel, ilyen például a Benzo[a]pirén, Dimetil-benzantracén, történő metabolikus aktiválást igényel.

A következő anyagok példák a törzsre jellemző pozitív kontrollanyagokra azon kísérletekben, amelyeket exogén metabolikus aktiváló rendszer nélkül hajtunk végre.

| Anyag | CAS szám | Einecs szám | Törzs |
|---|---|---|---|
| Nátrium-azid | 26628-22-8 | 247-852-1 | TA 1535 és TA 100 |
| 2-Nitro-fluorén | 607-57-8 | 210-138-5 | TA 98 |
| 9-Amino-akridin | 90-45-9 | 201-995-6 | TA 1537, TA 97 és TA 97a |
| ICR 191 | 17070-45-0 | 241-129-4 | TA 1537, TA 97 és TA 97a |
| Kumén-hidroperoxid | 80-15-9 | 201-254-7 | TA 102 |
| Mitomicin C | 50-07-7 | 200-008-6 | WP2 uvrA és TA 102 |
| 1-etil-3-nitro-1-N-nitrozo-guanidin | 70-25-7 | 200-730-1 | WP2, WP2uvrA és WP2uvrA (pKM101) |
| 4-Nitro-kinolin-1-oxid | 56-57-5 | 200-281-1 | WP2, WP2uvrA és WP2uvrA (pKM101) |
| Furil-furamid (AF2) | 3688-53-7 | | Plazmid hordozó törzsek |

Használhatók más megfelelő pozitív kontroll referenciaanyagok is. Olyan pozitív kontrollanyagok használatát kell mérlegelni, amelyek ugyanazon kémiai osztályba tartoznak, mint a vizsgált anyag, ha rendelkezésre állnak ilyenek.

A vizsgálatba bevonják a vizsgált anyagot nem tartalmazó, egyedül oldószerből vagy vivőanyagból álló és egyébként a kezelt csoportokkal azonos módon kezelt negatív kontrollanyagokat. Ezenkívül nem kezelt kontrollokat is használnak, kivéve, ha vannak olyan történeti kontrolladatok, amelyek bizonyítják, hogy semmilyen káros vagy mutagén hatást nem idéz elő a kiválasztott oldószer.

1.5.3. **A kísérlet végrehajtása**

A lemezöntéses módszer (1), (2), (3), (4) esetében metabolikus aktiválás nélkül, rendszerint 0,05 ml vagy 0,1 ml vizsgált oldatot, 0,1 ml friss baktérium tenyészetet (amely körülbelül $10^8$ életképes sejtet tartalmaz) és 0,5 ml steril pufferoldatot összekevernek 2,0 ml rétegelt felülöntő agarral. Metabolikus aktiválással végrehajtott vizsgálathoz rendszerint megfelelő mennyiségű posztmitokondriális frakciót (a metabolikus aktiváló keverékben 5-től 30 térfogatszázalékig terjedő tartományban) tartalmazó 0,5 ml metabolikus aktiváló keveréket összekevernek felülöntő agarral (2,0 ml), a baktériummal és vizsgált anyaggal/vizsgált oldattal együtt. Összekeverjük minden egyes kémcső tartalmát, és egy minimális felülöntő agar felületére öntjük. Engedjük, hogy az agar inkubálás előtt megszilárduljon.

Előinkubációs módszer (2), (3), (5), (6) esetében a vizsgált anyagot/vizsgált oldatot előinkubálják a vizsgált törzzsel (körülbelül $10^8$ életképes sejtet tartalmaz) és steril pufferoldattal vagy a metabolikus aktiváló rendszerrel (0,5 ml), rendszerint 20 percig vagy ennél hosszabb ideig 30- 37°C hőmérsékleten a felülöntő agarral való összekeverés és minimális agar lemez felületére öntés előtt. Rendszerint 0,05 vagy 0,1 ml vizsgált anyagot/vizsgált oldatot, 0,1 ml baktériumot és 0,5 ml S9 keveréket vagy steril pufferoldatot keverünk 2 ml felülöntő agarhoz. A kémcsöveket levegőztetjük az előinkubálás során rázókészülék segítségével.

A változás megfelelő becsléséhez három lemezt kell használni minden egyes dózisszinten. Ha tudományosan indolkolt, két lemez használata elfogadható. Valamely lemez esetenkénti elvesztése nem szükségképpen érvényteleníti a vizsgálatot.

Gázok vagy illékony anyagok megfelelő módszerekkel, például légmentesen zárt edényekben, vizsgálhatók (12), (14), (15), (16).

1.5.4. **Inkubálás**

Egy adott vizsgálatban részt vevő minden lemezt 37 °C hőmérsékleten 48-72 órán át inkubálnak. Az inkubációs időtartam után meg kell számolni lemezenként a revertáns telepek számát.

## 2. ADATOK

### 2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az adatokat a lemezenkénti revertáns telepek számaként kell megadni. Mind a negatív (oldószerkontroll és nem kezelt kontroll, ha használatra került) mind a pozitív kontroll-lemezeken lévő revertáns telepek számát is fel kell jegyezni. Meg kell adni az egyes lemezekhez tartozó számokat, lemezenként a revertáns telepek átlagértékét és a standard eltérést a vizsgált anyaghoz és a pozitív és negatív (nem kezelt és/vagy oldószer) kontrollokhoz képest.

A nyilvánvalóan pozitív reakció igazolása nem szükséges. A többféleképpen magyarázható eredményeket további, lehetőleg a kísérleti körülmények módosításával végrehajtott vizsgálattal kell tisztázni. A negatív eredményeket külön kísérletekkel kell megerősíteni. Azon esetekben, ahol nem tekintjük szükségesnek a negatív eredmények megerősítését, meg kell indokolni e döntést. Megfontolandó az utólagos ellenőrző kísérletekben a vizsgált körülmények tartományának kiterjesztése érdekében a vizsgálati paraméterek módosítása. A módosítható vizsgálati paraméterek, többek között a koncentrációfelosztás, a kezelés módszere (lemezöntéses vagy folyadék előinkubációs) és a metabolikus aktiválási körülmények lehetnek.

### 2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a metabolikus aktiváló rendszer használatával vagy anélkül legalább egy törzsben a lemezenkénti revertáns telepek számának koncentrációval kapcsolatos növekedése a vizsgált tartományban és/vagy reprodukálható növekedése egy vagy több koncentráció mellett (23). Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (24). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy az anyag bázisszubsztitúcióval vagy kereteltolásokkal (frameshift) pontmutációkat idéz elő a *Salmonella typhimurium* és/vagy az *Escherichia coli*. génállományában. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem mutagén a vizsgált fajokban.

## 3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

– az oldószer kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Törzsek:

– használt törzsek,

– sejtek száma tenyészetenként,

– a törzs jellemzői.

Vizsgálati körülmények:

– a vizsgált anyag lemezenkénti mennyisége (mg/lemez vagy µl/lemez), és a koncentrációnként használt lemezek számának, valamint az alkalmazott dózisok indoklása,

– használt táptalajok,

– metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, az elfogadhatósági kritériumot is ideértve,

– kezelési eljárások.

Eredmények:

– toxicitás jelei,

– kicsapódás jelei,

– az egyes lemezek számértékei,

– lemezenként a revertáns telepek átlagértéke és a standard eltérés,

– dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

– statisztikai elemzések, ha vannak,

– az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

– történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

## 4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

(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*/Mannalian 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 Rec.* 307, pp. 335-344

(13) Prival, M. J., Bell. S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaugham, 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. 247-258

(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 Intestinel 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 Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing,* Part II, *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65"

*4. E. MELLÉKLET*

„**B.17. MUTAGENITÁS – *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓ VIZSGÁLAT EMLŐSSEJTEKEN**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG 476-nak, *in vitro* génmutáció vizsgálat emlőssejteken (1977).

1.1. BEVEZETÉS

Az *in vitro* génmutáció vizsgálat emlőssejteken kémiai anyagok által előidézett génmutációk észlelésére használható. Alkalmas sejtvonalak például az L5178Y egér limfomasejtek, a CHO, CHO-AS52-es és V79-es kínai hörcsög sejtvonalak és a TK6-os emberi limfoblasztoid törzsek (1). E törzsekben a legáltalánosabban használt genetikai végpontok a mutációt a timidin kinázban (TK) hipoxantin-guanin foszforibozil-transzferázban (HPRT) és a xantin-guanin foszforibozil-transzferáz (XPRT) transz-génjében mérik. A TK, HPRT és XPRT mutáció vizsgálatok a genetikai események különböző spektrumát észlelik. A TK és XPRT autosom helye lehetővé teheti az X-kromoszómákon a HPRT helyen nem észlelt genetikai események (például nagy delíciók) észlelését (2), (3), (4), (5), (6).

Az emlőssejteken végzett *in vivo* sejt génmutáció vizsgálatban megállapodott sejtvonalak és törzsek tenyészetei használhatók. A felhasznált sejtek a tenyészetben való növekedési képesség és a spontán mutációs gyakoriság stabilitása alapján kerülnek kiválasztásra.

Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatokhoz rendszerint a metabolikus aktiválás valamilyen exogén forrásának használata szükséges. E metabolikus aktiváló rendszer nem tudja teljes mértékben utánozni az emlős *in vivo* körülményeket. Ki kell szűrni azon körülményeket, amelyek fennállása esetén olyan pozitív eredmények születnek, amelyek nem tükrözik a belső mutációt előidéző képességet és valószínűleg a pH ill. az ozmolalitás változásából vagy a magas citotoxicitási szintből származnak (7).

E vizsgálat azon anyagok kiszűrésére használható, amelyek mutációt idézhetnek elő és rákot okozhatnak emlősállatok esetében. Az e vizsgálatban pozitív eredményt adó számos vegyület emlősállatok esetében rákkeltő vegyület; azonban nincs tökéletes korreláció az itt ismertetett vizsgálat és a rákkeltő képesség között. A korreláció függ a vizsgált anyag kémiai osztálytól és egyre több bizonyíték van arra, hogy léteznek olyan karcinogén anyagok, amelyeket e vizsgálat nem észlel, mivel úgy tűnik, hogy más, nem genotoxikus mechanizmusokon keresztül vagy olyan mechanizmusokon keresztül fejtik ki a hatásukat, amelyek nincsenek jelen baktériumokban (6).

Lásd még az Általános bevezetés B részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Előre/oda (forward) mutáció:** a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának változását vagy elvesztését eredményezi.

**Báziscserét okozó mutagének:** azok az anyagok, amelyek egy vagy több bázispár szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

**Frameshift mutagének:** azok az anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delícióját okozzák a DNS molekulához vagy molekulából.

**Fenotipusos expressziós idő:** z az időtartam, amely során a meg nem változott (eredeti) géntermékek kiürülnek az újonnan mutálódott sejtekből.

**Mutációs gyakoriság:** a megfigyelt mutáns sejtek aránya az életképes sejtek számával osztva.

**Relatív össznövekedés:** a sejtek számának növekedése az idő függvényében a sejtek kontrollpopulációjával összehasonlítva; ez a negatív kontrollhoz viszonyított szuszpenziós növekedés és a negatív kontrollhoz viszonyított klónképző készség szorzata.

**Relatív szuszpenziós növekedés:** a sejtszám növekedése az expressziós időtartam során a negatív kontrollhoz viszonyítva.

**Életképesség:** a kezelt sejtek klónozási hatékonysága szelektív körülmények között, szelektív médiumba való leültetés idején, az expressziós időszak után.

**Túlélési ráta:** a kezelt sejtek klónképző készsége a kezelési időszak végén; a túlélést rendszerint a kontroll sejtpopuláció túléléséhez viszonyítva fejezik ki.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ mutáció miatt timidin kináz deficiens sejtek ellenállnak a pirimidin bázisanalóg trifluorotimidin (TFT) citotoxikus hatásainak. A timidin-kináz proficiens sejtek érzékenyek a TFT-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Így tehát a mutáns sejtek képesek sejtburjánzásra TFT jelenlétében, míg a normál sejtek, amelyek timidin-kinázt tartalmaznak, nem képesek erre. Ehhez hasonlóan, a HPRT vagy XPRT deficiens sejtek 6-thioguaninnal (TG) vagy 8-azaguaninnal (AG) szembeni rezisztencia alapján választhatók ki. A vizsgált anyag tulajdonságait gondosan szemügyre kell venni, ha bázisanalógot vagy a szelektív ágenshez hasonló vegyületet vizsgálunk az emlőssejt génmutáció vizsgálatok valamelyikében. Például megvizsgáljuk a vizsgált anyag által gyaníthatóan okozható szelektív toxicitást a mutáns és nem mutáns sejtek tekintetében. Így kell megerősíteni a kiválasztó rendszer/hatóanyag megfelelőségét a szelektív ágenshez szerkezetileg hasonló kémiai anyagok vizsgálatakor (8).

Szuszpenzióban vagy egy rétegben növő tenyészetben (monolayer) lévő sejteket kezelünk a vizsgált anyaggal, metabolikus aktiválással és anélkül, megfelelő időtartamig, a citotoxicitás meghatározására és a fenotipusos expresszió lehetővé tételére a mutáns kiválasztása előtt (9), (10), (11), (12), (13). A citotoxicitást rendszerint a kezelési időtartam után a tenyészetek relatív klónképző készségnek (túlélési ráta) vagy relatív össznövekedésnek mérésével lehet meghatározni. A kezelt tenyészeteket elegendő időtartamig, amely a kiválasztott lokuszok és sejttípusok jellemzője, tartjuk a tápfolyadékban az előidézett mutációk közel optimális fenotipusos expressziójának lehetővé tételére. A mutációs gyakoriságot úgy határozzuk meg, hogy leültetünk ismert számú sejtet a szelekciós ágenst tartalmazó tápfolyadékba a mutáns sejtek kimutatására, valamint a szelekciós ágenst nem tartalmazó tápfolyadékban lévő ismert számú sejtre a klónképző készség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámolják a telepeket. A mutációs gyakoriságot a szelektív médiumban lévő mutáns telepek és a nem szelektív táptalajban lévő telepek számából határozzák meg.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *Sejtek*

Különböző sejttípusok állnak rendelkezésre e vizsgálathoz, ilyenek például az L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 vagy TK6-os sejtek szubklónjai. Az e vizsgálatban használt sejttípusoknak bizonyítottan érzékenyeknek kell lenniük a kémiai mutagén anyagokra, magas klónképző készséggel és alacsony spontán mutációs gyakorisággal kell rendelkezniük. A sejteket ellenőrizni kell mikoplazma-szennyeződés szempontjából, és nem szabad használni azokat, ha szennyezettek.

A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy előre meghatározott érzékenységű és hatásosságú legyen. A sejtek számának, tenyészeteknek és a használt vizsgált anyag koncentrációinak e meghatározott paramétereket kell tükrözniük (14). A kezelést túlélők és az e vizsgálatban az egyes szakaszokban használt életképes sejtek minimális számának a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Általános iránymutatás, hogy olyan sejtszámot kell használni, amely legalább 10-szerese a spontán mutációs gyakoriság inverzének. Azonban ajánlatos legalább $10^6$ sejt használata. A használt sejtrendszerre vonatkozó megfelelő történeti adatoknak kell rendelkezésre állniuk a vizsgálat ellentmondásmentességének igazolására.

1.4.1.2. *Tápfolyadék és tenyésztési körülmények*

Megfelelő tápfolyadékot és inkubációs körülményeket (tenyésztő edények, hőmérséklet, $CO_2$ koncentráció és páratartalom) kell biztosítani. A tápfolyadékot az e vizsgálatban használt szelekciós rendszereknek és sejttípusnak megfelelően választják ki. Olyan inkubációs körülményeket kell létrehozni, hogy biztosítva legyen a sejtek növekedése az expressziós időszak során és mind a mutáns, mind a nem mutáns sejtek kolóniaképzése optimális legyen.

1.4.1.3. *Tenyészetek előkészítése*

A sejteket törzstenyészetekről kell felszaporítani, leültetni tápfolyadékba és 37 °C hőmérsékleten inkubálni. A tenyészeteket, mielőtt e vizsgálatban felhasználnák, lehet hogy meg kell tisztítani az előzetesen már létező mutáns sejtektől.

1.4.1.4. *Metabolikus aktiválás*

A sejteket a vizsgált anyaggal kezelik, mind megfelelő metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében, mind anélkül. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorral kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amelyet enziminducerrel, ilyen például az Aroclor 1254 (15), (16), (17), (18), vagy a fenobarbiturát és ß-naftoflavon (19), (20), (21) kombinációjával kezelt rágcsálók májából készítettek.

A posztmitokondriális frakciót rendszerint 1-10 térfogatszázalék koncentráció tartományban használják a végtérfogatban. Valamely metabolikus aktiváló rendszer kiválasztása és állapota függhet a vizsgálatra kerülő kémiai anyag osztályától. Meghatározott esetekben megfelelőnek bizonyulhat a posztmitokondriális frakció egynél több koncentrációjának használata.

Számos fejlesztés, beleértve a speciális aktiváló enzimeket eltávolító, genetikailag szerkesztett törzsek létrehozását is, biztosíthatja az endogén aktiválás lehetőségét. A használt törzsek kiválasztását tudományosan indokolni kell (például a vizsgált anyag anyagcseréjéhez a citokróm P450-es izoenzim alkalmazásának relevanciájával).

1.4.1.5. *A vizsgált anyag/ előkészítés*

A szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben, vagy ha szükséges, hígítani kell a baktérium kezelése előtt. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgált rendszerekhez és/vagy hígíthatók kezelés előtt. Friss készítményeket kell használni, kivéve ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát jelzik.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer*

Oldószerként nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal, és összeegyeztethetőnek kell lennie a baktérium túlélésével és az S9-es aktivitással (22). Ha a jól ismert oldószertől eltérő oldószereket használnak, ezek használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző adatokkal. Elsőként valamilyen vizes oldószer használatát kell megfontolni. Vízben instabil anyagok vizsgálatakor a használt szerves oldószereknek vízmenteseknek kell lenniük. A víz valamilyen molekulaszűrő alkalmazásával távolítható el.

1.4.2.2. *Expozíciós koncentrációk*

A legnagyobb koncentráció meghatározásakor megfontolandó kritériumok közé a következők tartoznak: citotoxicitás, a vizsgálati rendszerben való oldhatóság és pH-érték vagy ozmolalitás változások.

A citotoxicitást a fő kísérletben metabolikus aktiválással és anélkül határozzák meg a sejtintegritás és szaporodás olyan megfelelő mutatóinak segítségével, mint például a relatív klónképző készség (túlélési ráta) vagy a relatív össznövekedés. Hasznosnak bizonyulhat a citotoxicitás és az oldékonyság meghatározása előzetes kísérletben.

Legalább négy elemezhető koncentrációt kell használni. Ahol létezik citotoxicitás, e koncentrációknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt; ez rendszerint azt fogja jelenteni, hogy a koncentrációszinteket nem nagyobb, mint egy 2 és $\sqrt{10}$ közötti tényező választja el egymástól. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, ennek körülbelül 10-20 % (de nem kevesebb, mint 10 %) relatív túlélést (relatív klónképző készséget) vagy relatív össznövekedést kell eredményeznie. Viszonylag nem citotoxikus anyagok esetében a legnagyobb vizsgált koncentrációnak 5 mg/ml-nek, 5 µl/ml-nek vagy 1,01 M-nak, amelyik ezek közül a legkisebb, kell lennie.

A rosszul oldódó anyagokat a tenyésztési körülmények melletti oldékonyságuk határáig vagy azon túl kell vizsgálni. Meg kell határozni az oldhatatlanság bizonyítékát abban a végső kezelési médiumban, amely hatásainak a sejtek ki vannak téve. Hasznosnak bizonyulhat az oldékonyság értékelése a kezelés kezdetén és végén, mivel az oldékonyság változhat a vizsgálati rendszerben az expozíció során a sejtek, S9, és a szérum stb. jelenléte miatt. Az oldódás hiánya szabad szemmel észlelhető. A kicsapódás nem befolyásolhatja az értékelést.

1.4.2.3. *Kontrollanyagok*

Minden kísérletben negatív és pozitív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagot használnak egyidejűleg, metabolikus aktiválással és anélkül. Metabolikus aktiválás alkalmazásakor a pozitív kontroll kémiai anyagnak olyannak kell lennie, amely a mutagén reakció kiváltásához aktiválást igényel.

A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

| Aktivációs körülmények | Lokusz | Anyag | CAS szám | Einecs szám |
|---|---|---|---|---|
| Exogén metabolikus aktiválás nélkül | HPRT | Etil-metán-szulfonát | 62-50-0 | 200-536-7 |
| | | N-etil-N-nitrozo-karbamid | 759-73-9 | 212-072-2 |
| | TK (kicsi és nagy telepek) | Metil-metán-szulfonát | 66-27-3 | 200-625-0 |
| | XPRT | Etil-metán-szulfonát | 62-50-0 | 200-536-7 |
| | | N-etil-N-nitrozo-karbamid | 759-73-9 | 212-072-2 |
| Exogén metabolikus aktiválással | HPRT | 3-Metil-kolantrén | 56-49-5 | 200-276-4 |
| | | N-nitrozo-dimetil-amin | 62-75-9 | 200-549-8 |
| | | 7,12-Dimetil-benz[a]antracén | 57-97-6 | 200-359-5 |
| | TK (kicsi és nagy telepek) | Ciklofoszfamid | 50-18-0 | 200-015-4 |
| | | Ciklofoszfamid monohidrát | 6055-19-2 | |
| | | Benz[a]pirén | 50-32-8 | 200-028-5 |
| | | 3-Metil-kolantrén | 56-49-5 | 200-276-5 |
| | XPRT | N-nitrozo-dimetil-amin (magas S9-es szintekhez) | 62-75-9 | 200-549-8 |
| | | Benz[a]pirén | 50-32-8 | 200-028-5 |

Használhatók más megfelelő pozitív kontroll referenciaanyagok, például ha valamely laboratórium rendelkezik 5-Bróm 2'-dezoxi-uridinre vonatkozó (Cas száma 59-14-3, Einecs száma 200-415-9) történeti adatbázissal, e referenciaanyag is használható. Azon pozitív kontroll kémiai anyagok használatát is meg kell fontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos kémiai osztályba tartoznak, ha rendelkezésre állnak ilyenek.

Használni kell negatív kontrollanyagokat, amelyek csak oldószert vagy vivőanyagot tartalmaznak a kezelési médiumban, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt csoportoké. Ezenkívül nem kezelt kontrollokat is használni kell, kivéve ha léteznek olyan történeti kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy semmilyen káros vagy mutagén hatása nincs a kiválasztott oldószernek.

1.4.3. **A kísérlet végrehajtása**

1.4.3.1. *Kezelés a vizsgált anyaggal*

A proliferáló sejteket kezelni kell a vizsgált anyaggal, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Az expozíciónak alkalmas időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3-6 óra). Az expozíciós idő kiterjedhet egyetlen vagy több sejtciklusra.

Minden egyes vizsgált koncentrációhoz két párhuzamos vagy egy (szimpla) kezelt tenyészet használható. Szimpla tenyészetek használatakor meg kell növelni a koncentrációk számát az elemzéshez megfelelő számú tenyészet biztosítása érdekében (legalább 8 elemezhető koncentráció létezzen). Két párhuzamos negatív (oldószer) kontrolltenyészetet kell használni.

Gázok vagy illékony anyagok megfelelő módszerekkel, például légmentesen zárt edényekben vizsgálhatók (21), (22).

1.4.3.2. *A túlélési ráta, az életképesség és mutációs gyakoriság meghatározása*

Az expozíciós időszak végén a sejteket le kell mosni, begyűjteni és leültetni a klónképző készség meghatározása és a mutáns fenotípusok eltávolításának érdekében. A citotoxicitás mérését a tenyészetek relatív klónképző készségének (túlélési ráta) vagy a relatív össznövekedésének meghatározásával, rendszerint a kezelési időtartam után kell megkezdeni.

Minden egyes lokusznak szüksége van egy meghatározott minimális időre az újonnan indukált mutánsok közel optimális fenotípusos kifejlődéséhez (a HPRT és XTRT legalább 6-8 napot és a TK legalább 2 napot igényel). A sejteket szelektív ágenst tartalmazó tápfolyadékban kell tenyészteni a mutánsok számának, illetve a klónképző készség hatékonyságának meghatározása céljából. Az életképesség (amelyet a mutációs gyakoriság kiszámítására használunk) mérése az expressziós idő végén kezdődik nem szelektív médiumba való ültetéssel.

Ha a vizsgált anyag az L5178Y $TK^{+/-}$ vizsgálatban pozitív eredményt ad, telepméret-megállapítást kell végezni a vizsgált tenyészetek közül legalább egynél (a legnagyobb pozitív koncentrációnál) és a negatív és pozitív kontrolloknál. Ha a vizsgált anyag az L5178Y $TK^{+/-}$ vizsgálatban negatív eredményt ad, a telepméret-megállapítást a negatív és pozitív kontrollokon kell végrehajtani. A TK6$TK^{+/-}$-t használó vizsgálatokban is végrehajtható telepméret megállapítás.

## 2. ADATOK

### 2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Meg kell adni a citotoxicitást és az életképességet, telepszámokat és mutációs gyakoriságot a kezelt és kontrolltelepek tekintetében. Ha az L5178Y $TK^{+/-}$ vizsgálat pozitív eredményt ad a telepeket a kis és nagy telepek kritériuma segítségével értékelik a vizsgált anyag legalább egy koncentrációja (legnagyobb pozitív koncentráció) mellett és a negatív és pozitív kontroll esetében. Már részletesen megvizsgálták mind a nagy, mind a kis telepmutánsok molekuláris és citogenetikus természetét (23) (24). A $TK^{+/-}$ vizsgálatban a telepeket a normálisan növekvő (nagy) és lassan növekvő (kis) telepek kritériuma segítségével értékelik (25). A jelentős mértékű genetikai károsodást szenvedett mutáns sejtek esetében meghosszabbodtak a kétszerezési idők, és így ezek kis telepeket alkotnak. E károsodás jellemzően a teljes génveszteségektől a kariotípusosan felismerhető kromoszóma-rendellenességekig terjed. A kis telepmutánsok létrejötte nagymértékű kromoszóma-rendellenességeket előidéző kémiai anyagokkal volt kapcsolatos (26). A kevésbé súlyosan érintett mutáns sejtek a szülősejtekhez hasonló ütemben növekednek és nagy telepeket alkotnak.

Meg kell adni a túlélési rátát (relatív klónképző készség) vagy a relatív össznövekedést. A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek száma és a túlélő sejtek száma hányadosaként kell kifejezni.

Fel kell jegyezni az egyes tenyészetek adatait. Ezen adatokat táblázat formájában kell összefoglalni.

A nyilvánvalóan pozitív reakció igazolása nem szükséges. A többféleképpen magyarázható eredményeket további, lehetőleg a kísérleti körülmények módosításával végrehajtott vizsgálattal kell tisztázni. A negatív eredményeket külön kísérletekkel kell megerősíteni. Azon esetekben, ahol nem tekintik szükségesnek a negatív eredmények megerősítését, meg kell indokolni e döntést. Megfontolandó az utólagos ellenőrző kísérletekben a vizsgált körülmények tartományának kiterjesztése érdekében a vizsgálati paraméterek módosítása. A módosítható vizsgálati paraméterek, többek között, a koncentráció intervallumok és a metabolikus aktiválás.

### 2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a mutációs gyakoriság koncentrációval kapcsolatos növekedése vagy reprodukálható növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények kiértékelésének elősegítésére. Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az emlős *in vitro* sejt génmutáció vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált anyag génmutációkat idéz elő a felhasznált, tenyésztett emlőssejtekben. A reprodukálható pozitív koncentráció–hatás viszonynak van a legnagyobb jelentősége. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem idéz elő génmutációkat a felhasznált, tenyésztett emlőssejtekben.

## 3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

– az oldószer kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

– sejtek típusa és eredete,

– sejttenyészetek száma,

– passzálások száma, ha van ilyen,

– sejttenyészet fenntartásának módszerei, ha van ilyen,

– micoplazma hiánya.

Vizsgálati körülmények:

– koncentrációk és tenyészetek száma kiválasztásának indoklása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldékonysági határokat, ha rendelkezésre állnak,

– tápfolyadék összetétele, $CO_2$ koncentráció,

– a vizsgált anyag koncentrációja,

– az oldószer és a hozzáadott vizsgált anyag mennyisége,

– inkubációs hőmérséklet,

– inkubációs idő,

– kezelés időtartama,

– sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt,

– metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, az elfogadhatósági kritériumot is ideértve,

– pozitív és negatív kontrollok,

– expressziós időtartam hosszúsága (beleértve a leültetett sejtek számát, szubtenyészeteket és tápfolyadékok cseréjét),

– szelekciós ágens,

– kritériumok, amelyek eldöntik, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekintendők-e,

– az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek,

– azon telepek meghatározása, amelyek méretét és típusát figyelembe vettük (beleértve a »kis« és »nagy« telepekre vonatkozó kritériumokat is).

Eredmények:

– toxicitás jelei,

– kicsapódás jelei,

– a kezelési médium pH-jára és ozmolalitására vonatkozó adatok, ha ezek meghatározásra kerültek,

– telepméret, ha kiértékelésre került legalább a pozitív és negatív kontrollok esetében,

– a laboratórium alkalmassága a kis telepmutánsok észlelésére az L5178Y $TK^{+/-}$ rendszerrel, ahol szükséges,

– dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

– statisztikai elemzés, ha van ilyen,

– az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatai,

– történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel.

– mutációs gyakoriság.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **SZAKIRODALOM**

(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 Díploid 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. V., 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., Cambridge 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 Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or 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: Ticce, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airbone 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 Trufluoronthymidine, 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"

*4. F. MELLÉKLET*

## „B.23. EMLŐS SPERMIOGONIÁLIS KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉG VIZSGÁLAT

### 1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 483-nak, emlős spermiogoniális kromoszóma-rendellenesség vizsgálat (1997).

### 1.1. BEVEZETÉS

Az emlős spermiogoniális kromoszóma-rendellenesség vizsgálat célja azon anyagok azonosítása, amelyek strukturális kromoszóma-rendellenességeket okoznak emlősök spermiogonális sejtjeiben (1), (2), (3), (4), (5). A strukturális rendellenességek kétféle típusúak lehetnek, kromoszóma vagy kromatid. A kémiai mutagének többsége esetében az előidézett rendellenességek kromatid típusúak, de kromoszóma típusú rendellenességek is előfordulnak. E módszert nem a számszerű rendellenességek mérésére tervezték és szokásosan nem is e célra használják. A kromoszóma mutációk és ehhez hasonló folyamatok számos emberi genetikai betegség okozói.

E vizsgálat a spermiogoniális ivarsejtekben a kromoszómális történéseket mutatja ki, és ezért várhatóan előre jelezheti az ivarsejtek öröklődő mutációjának indukcióját.

E vizsgálathoz általában rágcsálókat kell használni. Ez az *in vivo* citogenetikus vizsgálat észleli a kromoszóma-rendellenességeket a spermiogoniális mitózisokban. Más célsejtek nem képezik tárgyát e módszernek.

A spermiogoniumokban a kromatid típusú rendellenességek észleléséhez a kezelést követő első mitiotikus sejtosztódást az előtt kell megvizsgálni, mielőtt elvesznének ezen elváltozások az azt követő sejtosztódásokban. A kezelt spermiogonium őssejtekről további információk kaphatók a diakinezis–metafázis I-ben, a kromoszóma típusú rendellenességek meiótikus kromoszóma-elemzésével.

Ezt az *in vivo* vizsgálatot annak vizsgálatára tervezték, hogy az ivarsejtekben is aktívak-e a testi sejtek mutagénei. Ezenkívül a spermiogonium-vizsgálat a mutációs kockázat kiértékeléséhez is lényeges annyiban, hogy lehetővé teszi az *in vivo* metabolizmus, farmakokinetika és DNS-reparáció tényezőinek vizsgálatát.

A herékben a spermiogoniumok számos generációja van jelen, amik a kémiai anyaggal szembeni érzékenység egész spektrumát átfogják. Így tehát az észlelt rendellenességek a kezelt spermiogonium-populációk halmozott reakcióját jelentik az egyre nagyobb számú differenciált spermiogonium-sejtek predominanciájával. A heréken belüli helyzetüktől függően, a spermiogoniumok különböző generációi exponálódhatnak vagy nem a keringés révén a fizikai és fiziológiai Sertoli sejtgát és a vér – here gát miatt.

Ha bizonyos jelek utalnak arra, hogy a vizsgált anyag vagy valamely reaktív metabolitja nem éri el a célszövetet, akkor e vizsgálat nem megfelelő.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

### 1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Kromatid típusú rendellenesség:** szerkezeti kromoszóma-károsodás, amely egy kromatid törésében vagy kromatidok közötti törésben és újraegyesítésben nyilvánul meg.

**Kromoszóma típusú rendellenesség:** szerkezeti kromoszóma-károsodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésben, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

**Gap:** egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus sérülés.

**Számszerű rendellenesség:** a kromoszómák számának eltérése a felhasznált sejteket jellemző normál számértéktől.

**Poliploida:** a haploid kromoszómaszám (n) egészszámú, de nem diploid (azaz 3n, 4n, és így tovább) megsokszorosódása.

**Szerkezeti rendellenesség:** a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében, mint a delíciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződés.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az állatoknak megfelelő expozíciós módon adagolják a vizsgált anyagot és a kezelés után megfelelő időpontokban elpusztítjuk őket. Az elpusztítás előtt az állatokat metafázis blokkoló szerrel (például kolchicin vagy Colcemid$^{O}$) kell kezelni. Ezután kromoszóma-készítményeket hozunk létre az ivarsejtekből és megfestjük azokat, majd elemezni kell a metafázisú sejteket a kromoszóma-rendellenességek megállapítására.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Rendszerint patkányokat, egereket és kínai hörcsögöket használnak, jóllehet bármilyen megfelelő emlős használata szóba jöhet. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell használni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a páratartalom értékének 50-60 % között kell lennie.

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba osztják. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek az elhelyezés miatti esetleges hatások. Ezt követően az állatokat egyenként kell azonosítani. Az állatokat legalább öt napig szoktatják a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. *Dózisok előkészítése*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitásukat bizonyító adatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

1.4.2.2. *Kontrollok*

Mindkét nemhez és minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokat kell alkalmazni. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrolloknak *in vivo* szerkezeti rendellenességeket kell létrehozniuk expozíciós koncentrációban úgy, hogy észlelhető legyen a növekedés (a háttérhez viszonyítva). A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. Elfogadható, hogy a pozitív kontroll beadása a vizsgált anyag beadási módjától eltérjen, és hogy csak egyetlen mintavételre kerüljön sor. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

| Anyag | CAS szám | Einecs szám |
|---|---|---|
| Ciklofoszfamid<br>Ciklofoszfamid monohidrát | 50–18–0<br>6055–19–2 | 200–015–4 |
| Ciklohexil-amin | 108–91–8 | 203–629–0 |
| Mitomicin-C | 50–07–7 | 200–008–6 |
| Akrilamid monomer | 79–06–1 | 201–173–7 |
| Trietilén-melamin | 51–18–3 | 200–083–5 |

Minden mintavétel alkalmával a negatív kontrollcsoportban lévő állatokat is figyelembe kell venni, amelyeknek csupán oldószert adagolnak, egyébként azonos bánásmódban kell részesíteni azokat a kezelt állatokkal, kivéve ha a történeti kontrolladatokból elfogadható értékek állnak rendelkezésre a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek állaton belüli sokfélesége és gyakorisága tekintetében. Ezenkívül használunk nem kezelt kontrollállatokat, kivéve ha vannak olyan történeti vagy nyilvánosságra hozott kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy a kiválasztott oldószer/vivőanyag semmilyen ártalmas vagy mutagén hatást nem hoz létre.

## 1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

### 1.5.1. **Állatok száma**

Minden egyes kezelt- és kontrollcsoport legalább öt elemezhető hím állatot tartalmaz.

### 1.5.2. **Kezelés lefolytatása**

A vizsgált anyagot lehetőleg egyetlen alkalommal adják be. A vizsgált anyagot két adagban is be lehet adni, ugyanazon a napon két alkalommal néhány órás időközzel, nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítésére. Más adagolási módok alkalmazását tudományosan indokolni kell.

A legnagyobb adaggal kezelt csoportnál a kezelés után két különböző időpontban mintát kell venni. Mivel a sejtciklus kinetikájára hatással lehet a vizsgált anyag, körülbelül 24 és 48 órával a kezelés után kell mintát venni. Az egyéb adagok estében a kezelés utáni 24 órában vagy 1,5 sejtciklusidő eltelte után kell mintát venni, kivéve ha más időpontról bebizonyososdott, hogy az megfelelőbb a hatások észlelésére (6).

Ezenkívül más mintavételi idők is alkalmazhatók. Olyan kémiai anyagok esetében, amelyek kromoszóma-visszamaradást idézhetnek elő vagy amelyek S fázistól független hatásokat fejthetnek ki, megfelelőbbnek bizonyulhatnak a korábbi mintavételi idők (1).

Valamely megismételt kezelés célszerűségét eseti alapon kell megállapítani. Megismételt kezelés esetén az állatokat 24 órával (1,5 sejtciklusidő) az utolsó kezelés után elpusztítják. További mintavételi idők alkalmazhatók, ahol szükséges.

Elpusztítás előtt az állatok hasüregébe adott injekcióval megfelelő adag metafázist blokkoló szert (például Colcemid$^{O}$ vagy kolchicin) fecskendezünk be. Ezután az állatokból mintákat kell venni megfelelő időközönként. Egerek esetében ez az időköz körülbelül 3-5 óra; kínai hörcsögök esetében ez az időköz körülbelül 4-5 óra.

1.5.3. **Dózisok**

Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeznek, mert nem állnak rendelkezésre alkalmas adatok, ezt ugyanabban a laboratóriumban, ugyanazon fajták, törzsek, nemek és kezelési menetrend alkalmazásával hajtják végre, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmaznak (5). Ha észlelhető toxicitás, három dózist használnak az első mintavételhez. E dózisoknak át kell fogniuk egy, a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételnél csak a legmagasabb adagot használják. A legmagasabb adag az a dózis, amely olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak.

Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének) adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. A legmagasabb adag olyan adagként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jelet a spermiogonium-sejtekben (például az első és második meiotikus metafázis esetében a spermiogonium mitózis arányának csökkenése; e csökkenésnek nem szabad 50 %-nál nagyobbnak lennie).

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúly dózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatásokat nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózisszint használatával végrehajtott teljes vizsgálat. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/100g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

1.5.6. **Kromoszóma-preparáció**

Közvetlenül az elpusztítás után sejtszuszpenziót vesznek mindkét heréből, azokat hipotonizálni kell, majd fixálni. A sejteket ezután elterítjük a tárgylemezen és megfestjük.

1.5.7. **Elemzés**

Minden egyes állat esetében legalább 100 jól kiterült metafázist kell elemezni (azaz, csoportonként minimum 500 metafázist). E szám csökkenthető amennyiben nagyszámú rendellenesség figyelhető meg. Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollokat is ideértve, önállóan kódolni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Mivel a fixálási eljárások gyakran a metafázisban lévő sejtek egy részének széttörését eredményezik, mely kromoszóma veszteséggel jár, ezért a kiértékelt sejtek tartalmaznak egy centromer számot, amely megfelel a 2n± 2 értéknek.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. A kísérleti egység maga az állat. Minden egyes állat esetében fel kell jegyezni a strukturális kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek számát és a sejtenkénti kromoszóma-rendellenességek számát. Fel kell sorolni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek különböző típusait a számukkal és gyakoriságukkal együtt kezelt és kontrollcsoportonként. A gap külön kerül feljegyzésre és szerepel a jelentésben, de rendszerint azokat nem kell beleszámolni a rendellenességek összgyakoriságba.

Ha mitózist, valamint meiózist figyelnek meg, meg kell határozni a spermiogonium-mitózisok arányát az első és második meiotikus metafázisokhoz viszonyítva, állatonként 100 osztódó sejt összes mintájában valamennyi kezelt és negatív kontrollállathoz tartozó citotoxicitás méréseként az esetleges citotoxikus hatás megállapítása érdekében. Ha csak mitózist figyelnek meg, a mitózisindexet állatonként legalább 1 000 sejtben kell meghatározni.

2.2. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a kromoszóma–rendellenességeket mutató sejtek relatív számának növekedése a dózis függvényében, vagy egy meghatározott időben történő mintavétel alkalmával egyetlen dóziscsoportban a rendellenességet mutató sejtek számának egyértelmű növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények kiértékelésének elősegítésére (8). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező. A többféleképpen magyarázható eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, lehetőleg a kísérleti körülményeket módosítva.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az *in vivo* spermiogonium kromoszóma-rendellenesség vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy valamely anyag strukturális kromoszóma-rendellenességeket idéz elő a kísérleti állatfajták ivarsejtjeiben. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált körülmények mellett, a vizsgált anyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket a kísérleti állatfajták ivarsejtjeiben.

Értékelni kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e a célszövetbe.

## 3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

– az oldószer kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

– használt fajok/törzs,

– állatok száma, kora,

– az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

– az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagértéket és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

– a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

– a dózisok kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag beadási módjának indoklása,

– a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó adatok,

– a vizsgált anyag beadására vonatkozó adatok,

– a kiválasztott elpusztítási időpontok indoklása

– átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható

– a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

– kezelési és mintavételi menetrend részletes leírása,

– toxicitás meghatározásának módszerei,

– metafázis blokkoló szer azonosítása, annak koncentrációja és kezelési időtartama,

– tárgylemez preparálásának módszerei,

– rendellenességek értékelésének kritériumai,

– az elemzett sejtek száma (állatonként),

– azon kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

– toxicitás jelei,

– mitotikus index,

– spermiogonium mitózisok aránya az első és második meiotikus metafázisokhoz viszonyítva,

– rendellenességek száma és típusa az egyes állatokban,

– csoportonként a rendellenességek össz-száma,

– csoportonként a rendellenességeket mutató sejtek száma,

– dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

– statisztikai elemzések, ha vannak,

– az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok,

– történeti negatív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

– az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok,

– ploidia megfigyelt változásai.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specification, 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 Tests, *Cytogenetics and Cell Genetics,* 3, pp. 289-294

(4) Richold, M., Ashby, J., Bootman, 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 1. 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”

*4. G. MELLÉKLET*

„**B.39. NEM ÜTEMEZETT DNS-SZINTÉZIS (UDS) *IN VIVO* VIZSGÁLAT EMLŐS MÁJSEJTEKKEL**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG 486-nak, emlős májsejtekkel végrehajtott nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) *in vivo* vizsgálat (1997).

1.1. BEVEZETÉS

Az emlős májsejtekkel végzett nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) *in vivo* vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek DNS-reparációt váltanak ki a kezelt állatok májsejtjeiben (1), (2), (3), (4).

Ez az *in vivo* vizsgálat lehetővé teszi a kémiai anyagoknak a májban okozott genotoxikus hatásainak vizsgálatát. A vizsgált végpont következtetni enged a májsejtekben a DNS-károsodásra és az ezt követő reparációra. A máj rendszerint az abszorbeált vegyületek metabolizmusának fő helyszíne. Ebből következően megfelelő hely DNS-károsodás *in vivo* vizsgálatára.

Ha bizonyos jelek utalnak arra, hogy a vizsgált anyag nem éri el a célszövetet, akkor e vizsgálat nem megfelelő.

A nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) végpontját a megjelölt nukleozidok felvételének meghatározásával lehet mérni azon sejtekben, amelyek nem mennek keresztül az ütemezett (S fázisú) DNS-szintézisen. A legelterjedtebben használt módszer a tríciummal megjelölt timidin ($^3$H-TdR) felvételének meghatározása autoradiográfiával. Az *in vivo* UDS-vizsgálatokban lehetőleg patkánymájat kell használni. Májszövetektől eltérő szövetek is használhatók, de ezek nem képezik e módszer tárgyát.

Az UDS-reakció észlelése a károsodás helyén a kivágott és helyettesített DNS-bázisok számától függ. Ezért tehát az UDS-vizsgálat különösen értékes az anyag által indukált hosszú szakaszú (»long-patch reparáció« 20-30 bázispár) észlelésére. Ezzel ellentétben a rövid szakaszú (»short-patch reparáció« 1-3 bázis) jóval kisebb érzékenységgel észlelhető. Ezenkívül mutagén hatások jöhetnek létre DNS-elváltozások helyre nem állítása, nem megfelelő helyreállítása vagy hibás replikációja miatt. Az UDS-reakció mértéke nem ad jelzést a reparációs folyamat megbízhatóságáról. Ezenkívül előfordulhat, hogy valamely mutagén reakcióba lép a DNS-sel, de nem történik meg a DNS-károsodás helyreállítása kivágásos reparáció révén (excision repair). A mutagén aktivitással kapcsolatban az UDS-vizsgálat által biztosított speciális információk hiányát e végpontnak a potenciális érzékenysége kompenzálja, mivel ennek mérése a teljes genomban történik.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

**Reparálódó sejtek:** a vizsgálatot végző laboratórium által előre megadott értéknél magasabb nettó sejtmagi szemcseszám (net nuclear grain, NNG).

**Nettó sejtmagi szemcseszám (NNG):** az autoradiográfiás UDS-vizsgálatokban az UDS aktivitás kvantitatív mértéke, amit úgy lehet megkapni, hogy a sejtmagi szemcsék számából (NG) le kell vonni a sejtmaggal azonos területű citoplazmára eső szemcsék számát(CG): NNG = NG – CG. Minden egyes sejthez ki kell számítani az NNG számokat, majd valamennyi tenyészetre és a párhuzamos tenyészetre is.

**Nem ütemezett DNS-szintézis (UDS):** kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS-károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS-szintézis.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az emlős májsejtekkel végrehajtott *in vivo* UDS-vizsgálat a kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS-károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS-szintézis. A vizsgálat rendszerint $^3$H-TdR-nek a májsejtek DNS-ébe való beépítésén alapul, ahol csak kis számú sejt található az S-fázisban. A $^3$H-TdR felvételét rendszerint auto-radiográfiásan határozzuk meg, mivel e módszer kevésbé érzékeny az S-fázisú sejtek zavaró hatására, mint például a folyadék szcintillációs módszer.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Rendszerint patkányokat használnak, de bármilyen megfelelő emlős használata szóba jöhet. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat használnak. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a páratartalom értékének 50-60 % között kell lennie.

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll és kezelt csoportokba osztják. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek az elhelyezés miatti esetleges hatások. Ezt követően az állatokat egyenként kell azonosítani. Az állatokat legalább öt napig szoktatják a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. *Vizsgált anyag/előkészület*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitásukat bizonyító adatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

1.4.2.2. *Kontrollok*

Minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokat alkalmazunk. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrollanyagoknak olyan anyagoknak kell lenniük, amelyekről ismert, hogy létrehoznak UDS-t olyan expozíciós szinten való beadáskor, amelyről várható, hogy a háttérszintet meghaladó észlelhető növekedést biztosít. Azon pozitív kontrollokat, amelyek metabolikus aktiválást igényelnek, olyan dózisban kell alkalmazni, ami mérsékelt reakciót vált ki (4). A dózisokat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

| Mintavételi idők | Anyag | CAS szám | Einecs szám |
|---|---|---|---|
| Korai mintavételi idők (2-4 óra) | N-Nitrozo-dimetil-amin | 62-75-9 | 200-249-8 |
| Késői mintavételi idők (12-16 óra) | 2-acetamido-fluorén | 53-96-3 | 200-188-6 |

Más megfelelő pozitív kontrollanyagok is használhatók. Elfogadható a pozitív kontrollanyagok vizsgált anyagtól eltérő módon való adagolása.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Állatok száma és neme**

Megfelelő számú állatot kell használni, azért hogy a vizsgált anyagra adott reakció során a természetes biológiai eltérést figyelembe lehessen venni. Csoportonként legalább három elemezhető állatnak kell lennie. Ahol az eddigiek során már jelentős adatbázist gyűjtöttünk össze, csak egy vagy két kísérleti állat szükséges az egyidejűleg alkalmazott negatív és pozitív kontrollcsoportokhoz.

Ha a tanulmány végrehajtásakor rendelkezésre állnak olyan adatok azonos fajták és azonos expozíciósmód használata mellett, amelyek azt mutatják, hogy nincsenek jelentős különbségek a nemek között a toxicitás tekintetében, elegendő lesz egyetlen nemhez tartozó állatok, lehetőleg a hímek vizsgálata. Ahol az emberek esetében az expozíció nemre jellemző lehet, mint például néhány gyógyszer esetében, a vizsgálatot a megfelelő nemű állatokkal kell elvégezni.

1.5.2. **Kezelési menetrend**

A vizsgált anyagot rendszerint egyetlen adagban adjuk be.

1.5.3. **Dózisok**

Rendszerint legalább két dózist használnak. A legmagasabb adag az a dózis, ami olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. Az alacsonyabb dózis a legmagasabb dózis 25 %-50 %-a.

Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének) adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeznek, mivel nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, ezt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzs, nem és kezelési rendszer használatával kell elvégezni, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmazunk.

A legnagyobb adag olyan adagként határozható meg, amely a májban a toxicitás valamilyen jelzését (például piknotikus nukleusz) váltja ki.

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalmommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúly dózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatásokat nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a teljes vizsgálatot elvégezni. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. Azonban a hasüregbe való beadás nem ajánlott, mivel ez közvetlenül teheti ki a májat a vizsgált anyag hatásának ahelyett, hogy ez a keringési rendszeren keresztül történne. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/100g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

1.5.6. **Májsejtek preparációja**

Májsejteket rendszerint 12-16 órával az adagolás után kell venni a kezelt állatokból. Általában szükség van egy további korai mintavételre (rendszerint a kezelés után 2-4 órával), ha nem jön létre egyértelmű, pozitív reagálás a kezelés után 12-16 órával. Azonban használhatók más mintavételi idők, amikor ez indokolt a toxikokinetikai adatok alapján.

Az emlős májsejtek rövid idejű (short term) tenyészeteit rendszerint úgy hozzák létre, hogy a májon in situ átáramoltatnak kollagenázt, és lehetővé teszik, hogy a frissen disszociált májsejtek hozzátapadjanak valamilyen alkalmas felülethez. A negatív kontrollállatokból származó májsejteknek legalább 50 %-os életképességűeknek kell lenniük (5).

1.5.7. **UDS meghatározása**

Frissen izolált emlős májsejteket inkubálunk $^{3}$H-TdR-t tartalmazó táptalajjal megfelelő időtartamig, például 3-8 órán át. Az inkubációs időszak végén a tápfolyadékot el kell távolítani a sejtekből, amely ekkor többlet, nem megjelölt timidint tartalmazó tápfolyadékkal inkubálható a be nem épült radioaktivitás eltávolítása érdekében (»cold chase«). A sejteket ezután le kell öblíteni, fixálni és szárítani. Hosszabb inkubációs idők esetén a cold chase elmaradhat. A lemezeket auto-radiografiás emulzióba kell meríteni, sötétben tárolni (például 7-14 napig hűtött helyen tartják), előhívni, megfesteni majd meg kell számolni az exponált ezüstszemcséket. 2-3 lemezt kell preparálni minden egyes állathoz.

1.5.8. **Elemzés**

A tárgylemez-preparátumoknak elegendő normál morfológiájú sejtet kell tartalmazniuk ahhoz, hogy elvégezhető legyen az UDS (helyzetet hűen kifejező) kiértékelése. A készítményeket mikroszkóp segítségével vizsgálják meg a nyilvánvaló citotoxicitás jeleit (például piknózis, radioaktív-jelölés csökkent értékei) keresve.

A tárgylemezeket kódolni kell a szemcseszámlálás előtt. Rendszerint 100 sejtet kell kiértékelni minden egyes állat esetében legalább két tárgylemezről; indokolni kell az állatonként kevesebb, mint 100 sejt értékelését. Az S-fázisú sejtmagok felett nem kell szemcséket számolni, de feljegyezhető az S-fázisú sejtek aránya.

Alkalmas módszerekkel meg kell határozni a $^{3}$H-TdR beépülési arányát a morfológiailag normál sejtek sejtmagjába és citoplazmájába úgy, ahogyan azt az ezüstszemcsék lerakódása mutatja.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Meg kell adni az egyes tárgylemezekhez és állatokhoz tartozó adatokat. Ezenkívül táblázat formájában össze is kell foglalni minden adatot. Minden egyes sejthez, minden állathoz és minden adaghoz és időhöz ki kell számítani a nettó sejtmagi szemcseszámokat (NNG), amelyet a CG-számoknak az NG-számokból való kivonásával kapunk meg. Ha megszámláljuk a »helyreállított sejteket«, indokoltnak és történeti vagy párhuzamos negatív kontrolladatokon alapulónak kell lennie a »helyreállított sejtek« kifejezés meghatározása kritériumának. A számszerű eredmények statisztikai módszerekkel kiértékelhetők. Ha használunk statisztikai vizsgálatokat, azokat még a kísérlet elvégzése előtt kell kiválasztani, és azt indokolni kell.

2.2. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Példák a pozitív/negatív reakció meghatározásának kritériumára:

| | | |
|---|---|---|
| Pozitív | i) | Laboratóriumi történeti adatok alapján indokolt, előre beállított küszöbérték fölötti NNG-értékek; |
| Vagy | ii) | Az egyidejűleg elvégzett kontrollnál lényegesen nagyobb NNG-értékek; |
| negatív | i) | A történeti kontroll küszöbérték alatti NNG-értékek; |
| Vagy | ii) | Az egyidejűleg elvégzett kontrollnál nem lényegesen nagyobb NNG-értékek. |

Meg kell vizsgálni az adatok biológiai jelentőségét, azaz figyelembe kell venni az olyan paramétereket, mint például az állatok közötti eltérés, dózis-reakció viszony és citotoxicitás. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények kiértékelésének elősegítésére. Azonban nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező valamely pozitív reagálás megállapítására.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az emlős májsejtekkel végrehajtott *in vivo* UDS-vizsgálatból kapott pozitív eredmény azt jelzi, hogy valamely vizsgált anyag olyan *in vivo* DNS-károsodást idéz elő emlős májsejtekben, amely *in vitro* reparálható nem ütemezett DNS-szintézissel. A negatív eredmény azt jelzi, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem idéz elő e vizsgálattal észlelhető DNS-károsodást.

Értékelni kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e az általános keringési rendszerbe ill. kifejezetten a célszövetbe (például szisztematikus toxicitás).

## 3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

– az oldószer kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

– használt fajok/törzs,

– állatok száma, kora és neme,

– az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

– az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagértéket és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

– pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagok,

– a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

– a dózisok kiválasztásának indoklása,

– a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

– a vizsgált anyag beadására vonatkozó részletek,

– a beadási mód megindoklása,

– módszerek annak ellenőrzésére, hogy elérte-e a vizsgált anyag az általános keringési rendszert vagy célszövetet, ha vannak ilyenek,

– átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

– a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

– kezelési és mintavételi menetrendek részletes leírása,

– toxicitás mérésének módszerei,

– májsejt preparálásának és tenyésztésének módszere,

– a használt autoradiográfiás módszer,

– elkészített tárgylemezek száma és értékelt sejtek száma,

– értékelési kritériumok,

– az arra vonatkozó kritériumok, hogy mikor kell a vizsgálatokat pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekinteni.

Eredmények:

– lemezenkénti, állatonlénti és csoportonkénti sejtmagi és citoplazmai szemcseszám átlagok, nettó sejtmagi szemcseszám átlagok,

– dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

– statisztikai elemzések, ha vannak,

– toxicitás jelei,

– az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok,

– történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

– a »helyreállított« sejtek száma, ha meghatározásra került,

– az S-fázisú sejtek száma, ha meghatározásra került,

– a sejtek életképessége.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. és 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”

*5. MELLÉKLET*

Lásd: A Bizottság 2001/59/EK irányelve, HL L 225., 2001.08.21., 1. o.

*6. MELLÉKLET*

„IX. MELLÉKLET

A. RÉSZ

**Gyermekbiztos zárószerkezetekre vonatkozó rendeletek**

Ezen irányelv 22. cikk (1) bekezdése e) pontjának rendelkezésein kívül a belégzésveszélyt (Xn: R65) képviselő és ezen irányelv VI. melléklete 3.2.3. bekezdésének megfelelően osztályozott és címkézett anyagokat tartalmazó mindenféle űrtartalmú tárolót fel kell szerelni gyermekbiztos zárószerkezettel, aeroszolok alakjában vagy zárt spray tartozékkal felszerelt tartályokban forgalomba hozott anyagok kivételével.

1. *Újrazárható csomagolás*

   Az újrazárható csomagolásokon használt gyermekbiztos zárószerkezetek megfelelnek a Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (International Standard Organisation, ISO) által elfogadott, a »gyermekbiztos zárószerkezet – újrazárható csomagolások vizsgálatának követelményei és módszerei« – re vonatkozó 8317-es ISO-szabványnak (1989. július 1-jei kiadás).

2. *Nem újrazárható csomagolás*

   A nem újrazárható csomagolásokon használt gyermekbiztos zárószerkezetek megfelelnek az Európai Szabványügyi Bizottság (European Committee for Standardisation, CEN) által elfogadott, a »csomagolás – gyermekbiztos zárószerkezet – nem gyószer termékekhez használt, nem újrazárható csomagolásokra vonatkozó követelmények és vizsgálati eljárások« – ra vonatkozó EN-862-es CEN-szabványnak (1997. márciusi kiadás).

3. *Megjegyzések*

   1. A fenti szabványoknak való megfelelést csak azon laboratóriumok igazolhatják, amelyek megfelelnek az EN-45 000-es európai szabványsorozatnak.

   2. Különleges esetek

      Ha nyilvánvalónak látszik, hogy a csomagolás megfelelően biztonságos a gyermekek számára, mivel nem tudnak hozzáférni annak tartalmához valamilyen eszköz igénybevétele nélkül, nem kell végrehajtani a vizsgálatot.

      Minden más esetben, és amikor kétségek merülnek fel annak tekintetében, hogy a lezárás biztonságos-e a gyermekek számára, a nemzeti hatóság megkérheti a termék forgalomba hozataláért felelős személyt a 3.1-ben leírt laboratórium által kiadott olyan tanúsítvány átadására, amely megállapítja, hogy vagy:

      – a zárószerkezet típusa olyan, hogy nincs szükség a fent hivatkozott ISO- és CEN-szabványnak megfelelő vizsgálat végrehajtására,

        vagy

      – a zárószerkezetet a fenn említett normákban meghatározott vizsgálatoknak vetették alá és megfelel az előírásoknak.

B. RÉSZ

**Tapintható figyelmeztető eszközökre vonatkozó rendelkezések**

A tapintható figyelmeztető eszközökre vonatkozó műszaki leírások megfelelnek a »csomagolás – tapintható veszélyfigyelmeztetések – követelmények« – re vonatkozó 11683-as EN-ISO-szabványnak (1997-es kiadás).”