32000L0032

L 136/1 *EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS* 8.6.2000.

KOMISIJAS DIREKTĪVA 2000/32/EK
(2000. gada 19. maijs),
ar ko 26. reizi tehnikas attīstībai pielāgo Padomes Direktīvu 67/548/EEK par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu (*)

(dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes Direktīvu 67/548/EEK (1967. gada 27. jūnijs) par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu (1), kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Eiropas Parlamenta un Padomes Direktīvu 1999/33/EK (2), un īpaši tās 28. pantu,

tā kā:

(1) Direktīvas 67/548/EEK I pielikumā dots bīstamu vielu saraksts, kurā ir informācija par katras tajā ietvertās vielas klasifikāciju un marķēšanu. Pašreizējās zinātnes un tehnikas atziņas liecina, ka šajā pielikumā norādīto bīstamo vielu saraksts būtu jāpielāgo. Direktīvas tulkojumos dažās valodās jāizdara labojumi noteiktās I pielikuma priekšvārda iedaļās un A tabulā.

(2) Direktīvas 67/548/EEK III pielikumā uzskaitītas frāzes, ar kurām norāda bīstamo vielu un preparātu kaitīgās iedarbības veidu. Direktīvas 67/548/EEK IV pielikumā ir bīstamu vielu un preparātu drošības ieteikumu uzskaitījums. Direktīvas 67/548/EEK VI pielikumā ir norādījumi par bīstamu vielu un preparātu klasifikāciju un marķēšanu. Direktīvas tulkojumos dažās valodās vajadzīgi labojumi III, IV un VI pielikuma noteiktās iedaļās.

(3) Direktīvas 67/548/EEK V pielikumā izklāstītas vielu un preparātu fizikāli ķīmisko īpašību, toksicitātes un ekotoksicitātes noteikšanas metodes. Minētais pielikums ir jāpielāgo tehnikas attīstībai.

(4) Direktīvas 67/548/EEK IX pielikums ietver noteikumus par bērniem nepieejamu aizdari. Šie noteikumi būtu jāpielāgo un jāpapildina. Nepieciešams paplašināt bērniem nepieejamu aizdaru lietošanas jomu.

(5) Šajā direktīvā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi Komiteja to direktīvu pielāgošanai tehnikas attīstībai, kuras attiecas uz tehnisko šķēršļu atcelšanu bīstamu vielu un preparātu tirdzniecībā,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Ar šo Direktīvu 67/548/EEK groza šādi.

1. Direktīvas I pielikumu groza šādi:

   a) ar piezīmi Q šīs direktīvas 1. A pielikumā aizstāj attiecīgo piezīmi priekšvārdā;

   b) ar rindām šīs direktīvas 1. B pielikumā aizstāj attiecīgās A tabulas rindas;

   c) attiecīgos šķirkļus aizstāj ar šķirkļiem šīs direktīvas 1. C pielikumā;

   d) iekļauj šīs direktīvas 1. D pielikuma šķirkļus.

2. Ar riska frāzi šīs direktīvas 2. pielikumā aizstāj attiecīgo frāzi III pielikumā.

3. Direktīvas IV pielikumu groza šādi:

   a) ar drošības frāzēm šīs direktīvas 3. A pielikumā aizstāj attiecīgās frāzes IV pielikumā;

(*) Pieņemta pēc divdesmit septītās pielāgošanas.
(1) OV 196, 16.8.1967., 1. lpp.
(2) OV L 199, 30.7.1999., 57. lpp.

b) ar kombinētajām drošības frāzēm šīs direktīvas 3. B pielikumā aizstāj attiecīgās frāzes IV pielikumā.

4. Direktīvas V pielikuma B daļu groza šādi:

a) ar šīs direktīvas 4. A pielikuma tekstu aizstāj B.10 nodaļu;

b) ar šīs direktīvas 4. B pielikuma tekstu aizstāj B.11 nodaļu;

c) ar šīs direktīvas 4. C pielikuma tekstu aizstāj B.12 nodaļu;

d) ar šīs direktīvas 4. D pielikuma tekstu aizstāj B.13 un B.14 nodaļu;

e) ar šīs direktīvas 4. E pielikuma tekstu aizstāj B.17. nodaļu;

f) ar šīs direktīvas 4. F pielikuma tekstu aizstāj B.23 nodaļu. Attiecīgi maina B.23 nodaļas virsrakstu skaidrojošajā piezīmē;

g) pievieno šīs direktīvas 4. G pielikuma tekstu.

5. Svītro ceturto ievilkumu V pielikuma C daļas vispārējā ievadā.

6. Ar šīs direktīvas 5. pielikuma tekstiem aizstāj attiecīgos VI pielikuma tekstus.

7. Saskaņā ar šīs direktīvas 6. pielikumu groza IX pielikumu.

2. pants

1. Dalībvalstīs stājas spēkā normatīvie un administratīvie akti, kas vajadzīgi, lai vēlākais līdz 2001. gada 1. jūnijam izpildītu šīs direktīvas prasības. Par to dalībvalstis tūlīt informē Komisiju.

Kad dalībvalstis pieņem šos noteikumus, tajos ietver atsauci uz šo direktīvu vai arī šādu atsauci pievieno to oficiālai publikācijai. Dalībvalstis nosaka, kā izdarāmas šādas atsauces.

2. Dalībvalstis dara zināmus Komisijai galvenos savu tiesību aktu noteikumus, ko tās pieņēmušas jomā, uz kuru attiecas šī direktīva, un šīs direktīvas un pieņemto valsts noteikumu korelācijas tabulu.

3. pants

Šī direktīva stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Kopienu Oficiālajā Vēstnesī*.

4. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 2000. gada 19. maijā

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Margot WALLSTRÖM

A PIELIKUMS

PRIEKŠVĀRDS I PIELIKUMAM

Paskaidrojumi piezīmēm, kas attiecas uz vielu identifikāciju, klasifikāciju un marķējumu

DA:

Q piezīme:

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 piezīme:

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.

(Neattiecas uz tekstu spāņu valodā (ES).)

(Neattiecas uz tekstu vācu valodā (DE).)

(Neattiecas uz tekstu grieķu valodā (EL).)

(Neattiecas uz tekstu angļu valodā (EN).)

(Neattiecas uz tekstu franču valodā (FR).)

(Neattiecas uz tekstu itāļu valodā (IT).)

(Neattiecas uz tekstu holandiešu valodā (NL).)

(Neattiecas uz tekstu portugāļu valodā (PT).)

(Neattiecas uz tekstu somu valodā (FI).)

1. B PIELIKUMS

A TABULA

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

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
006–011–00–7	karbarils (*ISO*) 1-naftilmetilkarbamāts		200–555–0	63–25–2	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22–40–50 S: (2-)22–24–36/37–46–61		
006–013–00–8	nātrija metāms (*ISO*) nātrija metilditiokarbamāts		205–293–0	137–42–8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50–53	C; N R: 22–31–34–43–50/53 S: (1/2-)26–36/37/39–45–60–61		
006–015–00–9	diurons (*ISO*) 3-(3,4-dihlorfenil)-l, 1-dimetilurīnviela		206–354–4	330–54–1	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R22–48/22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–48/22–50/53 S: (2-) 13–22–2 3-3 7–46–60–61		
006–016–00–4	propoksurs (*ISO*) 2-izopropoksifenil N-metilkarbamāts2-izopropoksifenil N-metilkarbamāts		204–043–8	114–26–1	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
006–017–00-X	aldikarbs (*ISO*) 2-metil-2-(metiltio)propanāl-O-(N-metilkarbamoil)oksīms		204–123–2	116–06–3	T+; R26/28 T; R24 N; R50–53	T+; N R: 24–26/28–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–018–00–5	aminokarbs (*ISO*) 4-dimetilamino-3-tolilmetilkarbamāts		217–990–7	2032–59–9	T; R24/25 N; R50–53	T; N R: 24/25–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
006–019–00–0	dialāts (*ISO*) S-(2,3-dihloralil)-N, N-diizopropiltiokarbamāts		218–961–1	2303–16–4	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)25–36/37–60–61		
006–020–00–6	barbans (*ISO*) 4-hlorbut-2-inil N-(3-hlorfenil)karbamāts		202–930–4	101–27–9	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–36/37–60–61		
006–023–00–2	merkaptodimeturs (*ISO*) metiokarbs 3,5-dimetil-4-metiltiofenil N-metilkarbamāts		217–991–2	2032–65–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)22–37–45–60–61		
006–024–00–8	nātrija proksāns (*ISO*) nātrija O-izopropilditiokarbamāts		205–443–5	140–93–2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51–53	Xn; N R: 22–38–51/53 S: (2-)13-61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
006–026–00–9	karbofurāns (*ISO*) 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurān-7-il N-metilkarbamāts		216–353–0	1563–66–2	T+; R26/28 N; R50–53	T+; N R: 26/28–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
006–028–00-X	dinobutons (*ISO*) 2-(1-metilpropil)- 4,6-dinitrofenilizopropilkarbonāts		213–546–1	973–21–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
006–029–00–5	dioksakarbs (*ISO*) 2-(1,3-dioksolān-2-il)fenil N-metilkarbamāts		230–253–4	6988–21–2	T; R25 N; R51–53	T; N R: 25–51/53 S: (1/2-)37–45–61		
006–033–00–7	metoksurons (*ISO*) 3-(3-hlor-4-metoksifenil)-1,1-dimetilurīnviela		243–433–2	19937–59–8	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
006–034–00–2	pebulāts (*ISO*) N-butil-N-etil-S-propiltiokarbamāts		214–215–4	1114–71–2	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)23-61		
006–035–00–8	pirimikarbs (*ISO*) 5,6-dimetil-2-dimetilamino-pirimidīn-4-il-N, N-dimetilkarbamāts		245–430–1	23103–98–2	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2)22–37–45–60–61		
006–037–00–9	promekarbs (*ISO*) 3-izopropil-5-metilfenil N-metilkarbamāts		220–113–0	2631–37–0	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)24–37–45–60–61		
006–038–00–4	sulfalāts (*ISO*) 2-hloralil N, N-dimetilditiokarbamāts	E	202–388–9	95–06–7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–22–50/53 S: 53–45–60–61		
006–039–00-X	trialāts (*ISO*) S-2,3,3-trihloralildiizopropiltiokarbamāts		218–962–7	2303–17–5	Xn; R22–48/22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–48/22–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
006–042–00–6	monurons (*ISO*) 3-(4-hlorfenil)-l, 1-dimetilurīnviela		205–766–1	150–68–5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
006–043–00–1	monurona trihloracetāts 3-(4-hlorfenil)-l, 1-dimetiluronija trihloracetāts		—	140–41–0	Xi; R36/38 Carc. Cat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 36/38–40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
006–045–00–2	metomils (*ISO*) 1-(metiltio)etilidenamino N-metilkarbamāts		240–815–0	16752–77–5	T+; R28 N; R50–53	T+; N R: 28–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–046–00–8	bendiokarbs (*ISO*) 2,2-dimetil-l, 3-benzodioksol-4-il N-metilkarbamāts		245–216–8	22781–23–3	T; R23/25 Xn; R21 N; R50–53	T; N R: 21–23/25–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–047–00–3	bufenkarbs (*ISO*) 3-(l-metilbutil)fenil N-metilkarbamāta un 3-(1-etilpropil)fenil N-metilkarbamāta maisījums		—	8065–36–9	T; R24/25 N; R50–53	T; N R: 24/25–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
006–048–00–9	etiofenkarbs (*ISO*) 2-(etiltiometil)fenil N-metilkarbamāts		249–981–9	29973–13–5	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
006–050–00-X	fenurona trihloracetāts 1,1-dimetil-3-feniluronija trihloracetāts		—	4482–55–7	Xi; R38 N; R50–53	Xi; N R: 38–50/53 S: (2-)60-61		
006–053–00–6	izoprokarbs (*ISO*) 2-izopropilfenil N-metilkarbamāts		220–114–6	2631–40–5	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
006–054–00–1	meksakarbāts (*ISO*) 3,5-dimetil-4-dimetilaminofenil N-metilkarbamāts		206–249–3	315–18–4	T+; R28 Xn; R21 N; R50–53	T+; N R: 21–2–8–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
006–057–00–8	nitrapirīns (*ISO*) 2-hlor-6-trihlormetilpiridīns		217–682–2	1929–82–4	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)24-61		
006–060–00–4	oksikarboksīns (*ISO*) 2,3-dihidro-6-metil-5-(N-fenilkarbamoil)- 1,4-oksotiīn 4,4-dioksīds		226–066–2	5259–88–1	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)61		
006–069–00–3	tiofanāta metilesteris (*ISO*) 1,2-di-(3-metoksikarbonil-2-tioureido)benzols		245–740–7	23564–05–8	Muta. Cat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
006–070–00–9	furmeciklokss N-cikloheksil-N-metoksi-2,5-dimetil-3-furamīds		262–302–0	60568–05–0	Carc. Cat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
006–088–00–7	benfurakarbs (*ISO*) etil-N-[2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofurān-7-iloksikarbonil(metil)aminotio]-N-izopropil-β-alanīnāts		—	82560–54–1	T; R23/25 N; R50–53	T; N R: 23/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
007–012–00–5	N, N-dimetilhidrazīna 1,1-dimetilhidrazīns	E	200–316–0	57–14–7	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 C;R34 N; R51–53	F; T; N R: 45–11–23/25–34–51/53 S: 53–45–61		
007–013–00–0	N. N-dimetilhidrazīna 1,2-dimetilhidrazīns	E	—	540–73–8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51–53	T; N R: 45–23/24/25–51/53 S: 53–45–61	C ≥ 25 %:T; R45–23/24/25 3 % £ C < 25 %:T; R45–20/21/22 0,01 % £ C< 3 %:T; R45	
009–003–00–1	fluorūdeņražskābe… %	B	231–634–8	7664–39–3	T+; R26/27/28 C; R35	T+; C R: 26/27/28–35 S: (1/2-)7/9–26–36/37–45	C ≥ 7 %:T+; C; R26/27/28–35 l % £ C < 7 %:T; R23/24/25–34 0, l % £ C < l %:Xn; R20/21/22–36/37/38	
015–039–00–9	azinfosa metilesteris (*ISO*) O, O-dimetil 4-oksobenztriazīn-3-il-metil fosforditioāts		201–676–1	86–50–0	T+; R26/28 T;R24 R43 N; R50–53	T+; N R: 24–26/28–43–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
015–048–00–8	fentions (*ISO*) O, O-dimetil-O-(4-metiltio-m-tolil)fosfortioāts		200–231–9	55–38–9	Muta. Cat. 3; R40 T; R2 3–48/25 Xn; R21/22 N; R50–53	T; N R: 21/22–23–40–48/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
015–056–00–1	azinfosa etilesteris (*ISO*) O, O-dietil 4-oksobenztriazīn-3-il-metilfosforditioāts		220–147–6	2642–71–9	T+; R28 T; R24 N; R50–53	T+; N R: 24–28–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
015–140–00–8	triazofoss (*ISO*) O, O-dietil-O-l-fenil-lH, 2,4-triazol-3-il-fosfortioāts		245–986–5	24017–47–8	T; R23/25 Xn; R21 N; R50–53	T; N R: 21–23/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
016–013–00-X	sēra dihlorīds		234–129–0	10545–99–0	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14–34–50 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61	C ≥ 10 %: C; R34 5 % £ C < 10 %: Xi; R36/37/38	

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
016–014–00–5	sēra tetrahlorīds		—	13451–08–6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14–34–50 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61	C ≥ 10 %: C; R34 5 % £ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
016–023–00–4	dimetilsulfāts	E	201–058–1	77–78–1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45–25–26–34–43 S: 53-45	C ≥ 25 %: T+; R45–25–26–34–43 10 % £ C < 25 %: T+; R45–22–26–34–43 7 % £ C < 10 %: T+; R45–22–26–36/37/38–43 5 % £ C < 7 %: T R45–22–23–36/37/38–43; 3 % £ C < 5 %: T; R45–22–23–43 1 % £ C < 3 %: T; R45–23–43 0,1 % £ C < 1 %: T; R45–20 0,01 % £ C < 0,1 %:T; R45	
016–024–00-X	dimeksano (*ISO*) *bis*(metoksitiokarbonil) disulfīds		215–993–8	1468–37–7	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
016–071–00–6	trinātrija-3-amino-6, l 3-dihlor-10-((3-((4-hlor-6-(2-sulfofenilamino)- 1,3,5-triazīn-2-il)amino)propil)amino]- 4,11-trifenoksidioksazīndisulfonāts		410–130–3	136248–03–8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–24–37		
022–001–00–5	titāna tetrahlorīds		231–441–9	7550–45–0	R14 C; R34	C R: 14-34 S: (1/2-)7/8–26–36/37/39–45	C ≥ 10 %: C; R34 5 % £ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
030–004–00–8	dimetilcinks [1] dietilcinks [2]		208–884–1 [1] 209–161–3 [2]	544–97–8 [1] 557–20–0 [2]	R14 F; R17 C; R34 N; R50–53	F; C; N R: 14–17–34–50/53 S: (1/2-)16–43–45–60–61		
050–002–00–0	ciheksatīns (*ISO*) hidroksitriciklohekslstannān tri(cikloheksil)alvas hidroksīds		236–049–1	13121–70–5	Xn; R20/21/22 N; R50–53	Xn; N R: 20/21/22–50/53 S:-(2-) 13–60–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
050–012–00–5	tetracikloheksilstannāns [1] hlortricikloheksilstannāns [2] butiltricikloheksilstannāns [3]		215–910–5 [1] 221–437–5 [2] 230–358–5 [3]	1449–55–4 [1] 3091–32–5 [2] 7067–44–9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50–53	Xn; N R: 20/21/22–50/53 S: (2-)26–28–60–61	C ≥ 1 %: Xn; R20/21/22	1
050–017–00–2	fenbutatīna oksīds (*ISO*) *bis*(*tris*(2-metil-2-fenilpropil)alvas)oksīds		236–407–7	13356–08–6	T+; R26 Xi; R36/38 N; R50/53	T+; N R: 26–36/38–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
082–009–00-X	svina sulfohromāta dzeltenais C. I. Dzeltenais pigments 34 [Šī viela identificēta Krāsvielu Indeksā ar numuru C. I. 77603.]		215–693–7	1344–37–2	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50–53	T; N R: 61–33–40–50/53–62 S: 53–45–60–61		1
082–010–00–5	svina hromāta molibdāta sulfāta sarkanais C. I. Sarkanais pigments 104. [Šī viela identificēta Krāsvielu Indeksā ar numuru C. I. 77605.]		235–759–9	12656–85–8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 R33 N; R50–53	T; N R: 61–33–40–50/53–62 S: 53–45–60–61		1
601–024–00-X	kumols [1] propilbenzols [2]		202–704–5 [1] 03–132–9 [2]	98–82–8 [1] 103–65–1 [2]	R 10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51–53	Xn; N R: 10–37–51/53–65 S: (2-)24–37–61–62		4
601–032–00–3	benzopirēns benz[*def*]krizēns		200–028–5	50–32–8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60–61 N; R50–53	T; N R: 45–46–60–61–50/53 S: 53–45–60–61		
601–034–00–4	benzacefenantrilēns		205–911–9	205–99–2	Carc. Cat. 2; R45 N; R50–53	T; N R: 45–50/53 S: 53–45–60–61		
602–035–00–2	1,4-dihlorbenzols p-dihlorbenzols		203–400–5	106–46–7	Xi; R36 N; R50–53	Xi; N R: 36–50/53 S: (2-)24/25–46–60–61		
602–054–00–6	3-jodopropēns aliljodīds		209–130–4	556–56–9	R 10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7–26–45		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
603–076–00–9	but-2-īn-l, 4-diols 2-butīn-l, 4-diols		203–788–6	110–65–6	T; R23/25 Xn; R21–48/22 C; R34	T R: 21–23/25–34–48/22 S: (1/2-)26–36/37/39–45	C ≥ 50 %: T;R21–23/25–34–48/22 25 % ≤ C < 50 %: T; R21–23/25–36/38–48/22 10 % £ C < 25 %: Xn; R20/22–48/22 3 % £ C < 10 %: Xn; R20/22	
603–091–00–0	ekso-1-metil-4-(l-metiletil)-7-oksabiciklo[2.2.1]heptān-2-ols		402–470–6	87172–89–2	O; R8 Xn; R22 Xi; R36	O; Xn R: 8–22–36 S: (2-)26		
603–093–00–1	ekso-(+/-)-l -metil-4-(l-metiletil)-2-[(2-metilfenil)metoksi]- 7-oksabiciklo[2.2.1]heptāns		402–410–9	87818–31–3	Xn; R20 N; R51–53	Xn; N R: 20–51/53 S: (2-)23-61		
603–097–00–3	1,1′, 1" - nitriltripropān-2-ols triizopropanolamīns		204–528–4	122–20–3	Xi; R36 R52–53	Xi R: 36–52/53 S: (2-)26-61		
603–117–00–0	propan-2-ols izopropilspirts izopropanols		200–661–7	67–63–0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11–36–67 S: (2-) 7–16–24/25–26		6
604–020–00–6	bifenil-2-ols 2-hidroksibifenils 2-fenilfenols (*ISO*)		201–993–5	90–43–7	Xi; R36/37/38 N; R50	Xi; N R: 36/37/38–50 S: (2-)22-61		
604–021–00–1	2-fenilfenola nātrija sāls nātrija 2-bifenilāts		205–055–6	132–27–4	Xn; R22 Xi; R37/38–41 N; R50	Xn; N R: 37/38–41–50 S: (2-)22–26–61		
604–024–00–8	4,4′-izobutiletilidēndifenols (alt.): 2,2-*bis*(4'hidroksifenil)- 4-metilpentāns		401–720–1	6807–17–6	Repr. Cat. 2; R60 Xi;R36 N; R50–53	T; N R: 60–36–50/53 S: 53–45–60–61		
604–041–00–0	acifluorfēns [1] acifluorfēna nātrija sāls [2] 5-[2-hlor-4-(trifluormetil)fenoksi]- 2-nitrobenzoskābe [1] nātrija 5-[2-hlor-4-(trifluormetil)fenoksi]- 2-nitrobenzoāts [2]		256–634–5 [1] 263–560–7 [2]	50594–66–6 [1] 62476–59–9 [2]	Xn; R22 Xi; R38–41 N; R50–53	Xn; N R: 22–38–41–50/53 S: (2-)24–39–60–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
604–043–00–1	monobenzons 4-hidroksifenilbenzilēteris hidrohinona monobenzilēteris		203–083–3	103–16–2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25–26–37		
604–044–00–7	mehinols 4-metoksifenols hidrohinona monometilēteris		205–769–8	150–76–5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22–36–43 S: (2-)24/25–26–37/39–46		
605–016–00–7	glioksāls… % etāndiāls… %	B	203–474–9	107–22–2	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20–36/38–40–43 S: (2-)36/37	C ≥ 10 %: Xn; R20–36/38–40–43 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R40–43	
606–016–00-X	pindons (*ISO*) 2-pivaloilindān-1, 3-dions		201–462–8	83–26–1	T; R25–48/25 N; R50–53	T; N R: 25–48/25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
606–018–00–0	dihlons (*ISO*) 2,3-dihlor-1,4-naftahinons		204–210–5	117–80–6	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50–53	Xn; N R: 22–36/38–50/53 S: (2-)26–60–61		
606–019–00–6	hlordekons (*ISO*) perhlorpentaciklo[5,3,0,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{4,8}$] dekān-5-ons decahlorpentaciklo[5,2,1,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{5,8}$] dekān-4-ons		205–601–3	143–50–0	Carc. Cat. 3; R40 T; R24/25 N; R50–53	T; N R: 24/25–40–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
606–034–00–8	metribuzīns (*ISO*) 4-amino-6-*tert* - butil-3-metiltio-l, 2,4-triazīn-5(4H)-ons 4-amino-4,5-dihidro-6-(l, 1-dimetiletil)- 3-metiltio-l, 2,4-triazīn-5-ons		244–209–7	21087–64–9	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
606–035–00–3	hloridazons (*ISO*) 5-amino-4-hlor-2-fenilpiridazīn-3-(2H)-ons pirazons		216–920–2	1698–60–8	R43 N; R50–53	Xi; N R: 43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
606–036–00–9	hinometionāts hinometionāts (*ISO*) 6-metil-l, 3-ditiolo(4,5-b)hinoksalīn-2-ons		219–455–3	2439–01–2	Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/21/22–48/22 Xi; R36 R43 N; R50–53	Xn; N R: 20/21/22–36–43–48/22–50/53–62 S: (2-)24–37–60–61		
606–037–00–4	triadimefons (*ISO*) 1-(4-hlorfenoksi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)butanons		256–103–8	43121–43–3	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
606–044–00–2	2,4,6-trimetilbenzofenons		403–150–9	954–16–5	Xn; R22 Xi; R36 N; R50–53	Xn; N R: 22–36–50/53 S: (2-)26–60–61		
607–043–00-X	dikamba (*ISO*) 2,5-dihlor-6-metoksibenzoskābe 3,6-dihlor-2-metoksibenzoskābe		217–635–6	1918–00–9	Xn; R22 Xi; R41 R52–53	Xn; N R: 22–41–52/53 S: (2-)26-61		
607–057–00–6	kumahlors (*ISO*) 3-[1-(4-hlorfenil)-3-oksobutil)- 4-hidroksi-kumarīns		201–378–1	81–82–3	Xn; R48/22 R52–53	Xn R: 48/22–52/53 S: (2-)37-61		
607–058–00–1	kumafurils (*ISO*) fumarīns (RS)- 3-(l-(2-furil)-3-oksobutil)- 4-hidroksikumarīns 4-hidroksi-3-[3-okso-1-(2-furil)butil]kumarīns		204–195–5	117–52–2	T; R25–48/25 R52–53	T R: 25–48/25–52/53 S: (1/2-)37–45–61		
607–079–00–6	kelevāns (*ISO*) etil-5-(perhlor-5-hidroksipentaciklo (5,3,0,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{4,8}$)dekān-5-il)-4-oksopentanoāts etil-5-(1,2,3,5,6,7,8,9,10,10-dekahlor-4-hidroksipentaciklo(5,2,1,$0^{2,6}$, $0^{3,9}$, $0^{5,8}$)dek-4-il)- 4-oksovalerāts		—	4234–79–1	T; R24 Xn; R22 N; R51–53	T; N R: 22–24–51/53 S: (1/2-)36/37–45–61		
607–097–00–4	benzol-l, 2,4-trikarbonskābes 1,2-anhidrīdstrimelītanhidrīds		209–008–0	552–30–7	Xi; R37–41 R42/43	Xn R: 37–41–42/43 S: (2-)22–26–36/37/39		
607–143–00–3	baldriānskābe		203–677–2	109–52–4	C; R34 R52–53	C R: 34–52/53 S: (1/2-)26–36–45–61		
607–152–00–2	2,3,6-TBS (*ISO*) 2,3,6-trihlorbenzoskābe		200–026–4	50–31–7	Xn; R22 N; R51–53	Xn; N R: 22–51/53 S: (2-)61		
607–153–00–8	benazolīns (*ISO*) 4-hlor-2,3-dihidro-2-okso-1,3-benzotiazol-3-il etiķskābe		223–297–0	3813–05–6	Xi; R36/38 R52–53	Xi R: 36/38–52/53 S: (2-)22-61		
607–156–00–4	hlorfensons (*ISO*) 4-hlorfenil-4-hlorbenzilsulfonāts		201–270–4	80–33–1	Xn; R22 Xi; R38 N; R50–53	Xn; N R: 22–38–50/53 S: (2-)37–60–61		
607–158–00–5	hloretiķskābes nātrija sāls nātrija hloracetāts		223–498–3	3926–62–3	T; R25 Xi; R38 N; R50	T; N R: 25–38–50 S: (1/2-)22–37–45–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
607–159–00–0	hlorbenzilāts (*ISO*) etil-2,2-di(4-hlorfenil)-2-hidroksiacetāts etil-4,4′-dihlorbenzilāts		208–110–2	510–15–6	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
607–176–00–3	α– 3-(3-(2H-benztriazol-2-il)-5-*tert* - butil-4-hidroksifenil)propionil-v-hidroksipoli (oksietilēna); α- 3-(3-(2H-benztriazol-2-il)-5-*tert* - butil-4-hidroksifenil)propionil-v-3-(3-(2H-benztriazol-2-il)- 5-*tert* - butil-4-hidroksifenil)propioniloksipoli(oksietilēna) maisījums		400–830–7	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)36/37–61		
607–188–00–9	nātrija N-karboksilatetil-N-oktadec-9-enilhidrogenmaleamāts		402–970–4	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24/37–61		
607–209–00–1	O, O-di(l-metiletil)tritio-*bis* - tioformiāta; O, O-di(l-metiletil)tetratio-*bis* - tio-formiāta; O, O-di(l-metiletil)pentatio-*bis* - tioformiāta maisījums		403–030–6	—	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
607–213–00–3	etil-3,3-bis[(l, 1-dimetilpropil)peroksi] butirāts		403–320–2	67567–23–1	E; R2 O; R7 R 10 N; R51–53	E; N R: 2–7–10–51/53 S: (2-)3/7–14–33–36/37/39–61		
607–217–00–5	2-etoksietil-2-[4-(2,6-dihidro-2,6-diokso-7-fenil-l, 5-dioksaindacen-3-il)fenoksi]acetāts		403–960–2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24–37–61		
607–243–00–7	nātrija 3,6-dihlor-o-anisāts [1] 3,6-dihlor-o-anīsskābes kompaunds ar 2,2′-iminodietanolu (1:1) [2] 3,6-dihlor-o-anīsskābes kompaunds ar 2-aminoetanolu (1:1) [3]		217–846–3 [1] 246–590–5 [2] 258–527–9 [3]	1982–69–0 [1] 25059–78–3 [2] 53404–28–7 [3]	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–248–00–4	nātrija naftalāms nātrija N-naft-1-ilftalamāts		205–073–4	132–67–2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2)		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
607–249–00-X	(1-metil-l, 2-etāndiil)*bis*[oksi(metil-2, l-etāndiil) diakrilāts tripropilēnglikola diakrilāts TPGDA		256–032–2	42978–66–5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51–53	Xi; N R: 36/37/38–43–51/53 S: (2-)24–37–61	C ≥ 10 %: Xi; R36/37/38–43 l % ≤ C < 10 %: Xi; R43	
607–252–00–6	lambda-cihalotrīns (*ISO*) (S)-α-ciano-3-fenoksibenzil (Z)-(1R)-*cis*- 3-(2-hlor- 3,3,3 -trifluorpropenil)-2,2-dimetilciklopropānkarboksilāta un (R)-α-ciano- 3-fenoksibenzil (Z)-(1S)-*cis*- 3-(2-hlor-3,3,3-trifluorpropenil)- 2,2-dimetilciklopropānkarboksilāta maisījums 1:1		415–130–7	91465–08–6	T+; R26 T; R25 Xn; R21 N; R50–53	T+; N R: 21–25–26–50/53 S: (1/2-) 28–36/37/39–38–45–60–61		
607–255–00–2	fluroksipirs (*ISO*) 4-amino-3,5-dihlor-6-fluor-2-piridiloksietiķskābe		—	69377–81–7	R52–53	R: 52/53 S: 61		
608–003–00–4	akrilnitrils	D E	203–466–5	107–13–1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38–41 R43 N; R51–53	F; T; N R: 45–11–23-/24/25–37/38–41–43–51/53 S: 9–16–53–45–61	C ≥ 20 %: T; R45–23/24/25–37/38–41–43 10 % ≤ C < 20 %: T; R45–23/24/25–41–43 5 % ≤ C < 10 %: T; R45–23/24/25–36–43 1 % ≤ C < 5 %: T; R45–23/24/25–43 0,2 % ≤ C < 1 %: T; R45–20/21/22 0,1 % ≤£ C < 0,2 %:T; R45	
608–016–00–5	1,4-diciano-2,3,5,6-tetrahlorbenzols		401–550–8	1897–41–2	R43 N; R50–53	Xi; N R: 43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
609–030–00–4	dinoterbs (*ISO*) 2-*tert* - butil-4,6-dinitrofenols	E	215–813–8	1420–07–1	Repr. Cat. 2; R61 T+; R28 T; R24 R44 N; R50–53	T+; N R: 61–24–28–44–50/53 S: 53–45–60–61		
609–040–00–9	nitrofēns (IS0) 2,4-dihlorfenil- 4-nitrofenilēteris	E	217–406–0	1836–75–5	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat.2; R61 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–61–22–50/53 S: 53–45–60–61		
609–044–00–0	teknazēns (*ISO*) 1,2,4,5-tetrahlor-3-nitrobenzols		204–178–2	117–18–0	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
611–008–00–4	4-aminoazobenzols 4-fenazoanilīns		200–453–6	60–09–3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50–53	T; N R: 45–50/53 S: 53–45–60–61		
611–013–00–1	trilitija 1-hidroksi-7-(3-sulfanil)-2-(3-metil-4-(2-metoksi-4-(3-sulfofenazo)fenazo)naftalīn-3-sulfonāts		403–650–7	117409–78–6	E; R2 N; R51–53	E; N R: 2–51/53 S: (2-)35-61		
611–031–00-X	4,4′-(4-iminocikloheksa-2,5-diēnilidenmetilēn) dianilīna hidrogenhlorīds C. I. Bāziskais sarkanais 9		209–321–2	569–61–9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612–035–00–4	2-metoksianilīns o-anizidīns	E	201–963–1	90–04–0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45–23/24/25 S: 53-45		
612–042–00–2	benzidīns 1,1′-bifenil-4,4-diamīns 4,4′-diamīnobifenils bifenil-4,4′-ilidendiamīns	E	202–199–1	92–87–5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–22–50/53 S: 53–45–60–61	C ≥ 25 %: T; R45–22 0.01 % ≤ C < 25 %: T; R45	
612–051–00–1	4,4′-diaminodifenilmetāns 4,4′-metilēndianilīns	E	202–974–4	101–77–9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R40 T; R39/23/24/25 Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51–53	T; N R: 45–39/23/24/25–43–48/20/21/22–51/53 S: 53–45–61		
612–081–00–5	4,4′-di-o-toluidīna sāļi 3.3′-dimetilbenzidīna sāļi o-toluidīna sāļi	A E	210–322–5 265–294–7 277–985–0	612–82–8 64969–36–4 74753–18–7	Carc. Cat. 2; R45 Xn; R22 N; R51–53	T; N R: 45–22–51/53 S: 53–45–61		
612–099–00–3	4-metil-m-fenilēndiamīns 2,4-toluildiamīns	E	202–453–1	95–80–7	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51–53	T; N R: 45–21–25–36–43–51/53 S: 53–45–61		
612–105–00–4	2-piperazīn-1-il-etilamīns		205–411–0	140–31–8	Xn; R21/22 C; R34 R52–53	C R: 21/22–34–43–52/53 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
612–111–00–7	2- metil-m-fenilēndiamīn-2,6-toluildiamīns		212–513–9	823–40–5	Muta. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51–53	Xn; N R: 21/22–40–43–51/53 S: (2-)24–36/37–61		
612–125–00–3	2- metil-p-fenilēndiamīn-2,5-toluildiamīns		202–442–1	95–70–5	T;R25 Xn; R20/21 R43 N; R51–53	T; N R: 20/21–25–43–51/53 S: (1/2-)24–37–45–61		
612–144–00–7	flumetralīns (*ISO*) N-(2-hlor-6-fluorbenzil)-N-etil-α, α, α-trifluor-2,6-dinitro-p-toluidīns		—	62924–70–3	Xi; R36/38 R43 N; R50–53	Xi; N R: 36/38–43–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
612–151–00–5	diaminotoluols	E	246–910–3	25376–45–8	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51–53	T; N R: 45–20/21–25–36–43–51/53 S: 53–45–61		
613–018–00–4	morfamkvats (*ISO*) 1,1′-*bis*(3,5-dimetilmorfolīnokarbonil-metil)-4,4-bipiridīlija jons		—	7411–47–4	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52–53	Xn R: 22–36/37/38–52/53 S: (2-)22–36–61		
613–031–00–5	simklozēns trihlorizocianūrskābes trihlor-1,3,5-triazīntrions		201–782–8	87–90–1	O; R8 Xn; R22 R31 Xi; R36/37 N; R50–53	O; Xn; N R: 8–22–31–36/37–50/53 S: (2-)8–26–41–60–61		
613–038–00–3	6-fenil-l, 3,5-triazīn-2,4-diil-diamino-6-fenil-l, 3,5-triazīn-2,4-diaminobenzguanamīns		202–095–6	91–76–9	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)61		
613–042–00–5	imazalils (*ISO*) 1-[2-(aliloksi)-2-(2,4-dihlorfenil)etil]-IH-imidazols		252–615–0	35554–44–0	Xn; R20/22 N; R41 N; R50–53	Xn; N R: 20/22–41–50/53 S: (2-)26–39–60–61		
613–043–00–0	imazalilsulfāts (*ISO*) 1-[2-(aliloksi)etil-2-(2,4-diholrfenil)]- 1H-imidazolija hidrogēnsulfāts [1] (±)-l-[2-(aliloksi)etil-2-(2,4-dihlorfenil)]-1H-imidazolija hidrogēnsulfāts [2]		261–351–5 [1] 281–291–3 [2]	58594–72–2 [1] 83918–57–4 [2]	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50–53	Xn; N R: 20/22–41–50/53 S: (2-)26–39–60–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
613–066–00–6	terbumetons (*ISO*) 2-*tert* - butilamino-4-etilamino-6-metoksi-1,3,5-triazīns		251–637–8	33693–04–8	Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
613–091–00–2	morfamkvata dihlorīds [1] morfamkvata sulfāts [2]		225–062–8 [1]	4636–83–3 [1] 29873–36–7 [2]	Xn; R22 Xi; R36/37/38 R52–53	Xn; R: 22–36/37/38–52/53 S: (2-)22–36–61		
613–098–00–0	N-(n-oktil)- 2-pirolidīn-ons		403–700–8	2687–94–7	C; R34 N; R51–53	C; N R: 34–51/53 S: (1/2-)23–26–36/37/39–45–61		
613–130–00–3	heksakonazols (*ISO*) (RS)- 2-(2,4-dihlorfenil)-l-(lH-1,2,4-triazol-1-il)heksān-2-ols		—	79983–71–4	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
613–131–00–9	pirokilons (*ISO*) 1,2,5,6-tetrahidropirolo[3,2,1 - *ij*] hinolīn-4-ons		—	57369–32–1	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)61		
613–134–00–5	miklobutanils (*ISO*) 2-(4-hlorfenil)-2-(lH-1,2,4-triazol-1-il-metil) heksil nitrils		—	88671–89–0	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51–53	Xn; N R: 22–36–51/53–63 S: (2-)36/37–46–61		
613–137–00–1	metabenztiazurons (*ISO*) 1-(1,3-benztiazol-2-il)1,3-dimetilurīnviela		242–505–0	18691–97–9	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
613–139–00–2	metsulfurona metilesteris metil 2-(4-metoksi-6-metil-l, 3,5-triazīn-2-il-karbamilsulfamil) benzoāts		—	74223–64–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
614–001–00–4	nikotīns (*ISO*) 3-(N-metil-2-pirolidinil)piridīns		200–193–3	54–11–5	T+; R27 T; R25 N; R51–53	T+; N R: 25–27–51/53 S: (1/2-)36/37–45–61		
614–006–00–1	brucīns 2,3-dimetoksistrihnīns		206–614–7	357–57–3	T+; R26/28 R52–53	T+ R: 26/28–52/53 S: (1/2-)13–45–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
614–007–00–7	brucīna sulfāts [1] brucīna nitrāts [2] Strihnidīn-10-ons, 2,3-dimetoksi-, mono[(R)-l-metilheptil-1,2-benzdikarboksilāts] [3] Strihnidīn-10-ona 2,3-dimetoksi-, kompaunds ar (S)-mono(l-metilheptil-l, 2-benzdikarboksilātu (1:1) [4]		225–432–9 [1] 227–317–9 [2] 269–439–5 [3] 269–710–8 [4]	4845–99–2 [1] 5786–97–0 [2] 8239–26–9 [3] 68310–42–9 [4]	T+; R26/28 R52–53	T+ R: 26/28–52/53 S:(1/2-)13–45–61		
615–006–00–4	2-metil-m-fenilēndiizocianāts [1] 4-metil-m-fenilēndiizocianāts [2] m-tolilidēndiizocianāts [3] toluil-2,6-diizocianāts [1] toluil-2,4-diizocianāts [2] toluildiizocianāts [3]	C	202–039–0 [1] 209–544–5 [2] 247–722–4 [3]	91–08–7 [1] 584–84–9 [2] 26471–62–5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52–53	T+ R: 26–36/37/38–40–42/43–52/53 S: (1/2-)23–36/37–45–61	C ≥ 20 %: T+; R26–36/37/38–40–42/43 7 % ≤ C < 20 %: T+; R26–40–42/43 1 % ≤ C < 7 %: T; R23–40–42/43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20–42	2
616–010–00–9	tozilhloramīda nātrija sāls		204–854–7	127–65–1	Xn; R22 R31 C; R34 R42	C R: 22–31–34–42 S: (1/2-)7–22–26–36/37/39–45		
616–034–00-X	pirakarbolīds (*ISO*) 3,4-dihidro-6-metil-2H-pirān-5-karboksanilīds		246–419–4	24691–76–7	R52–53	R: 52/53 S:61		
616–035–00–5	cimoksanils 2-ciano-N-[(etilamino)karbonil]- 2-(metoksiimino)acetamīds		261–043–0	57966–95–7	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
617–004–00–9	1,2,3,4-tetrahidro-l-naftilhidroperoksīds		212–230–0	771–29–9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50–53	O; C; N R: 7–22–34–50/53 S: (1/2-)3/7–14–26–36/37/39–45–60–61	C ≥ 25 %: C; R22–34 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
617–006–00-X	*bis*(α, α-dimetilbenzil)peroksīds		201–279–3	80–43–3	O; R7 Xi; R36/38 N; R51–53	O; Xi; N R: 7–36/38–51/53 S: (2-)3/7–14–36/37/39–61		
617–008–00–0	dibenzoilperoksīds benzoilperoksīds		202–327–6	94–36–0	E; R2 Xi; R36 R43	E; Xi; R: 2–36–43 S: (2-)3/7–14–36/37/39		
650–007–00–3	hlordimeforms (*ISO*) N^2 - (4-hlor-o-tolil)-N^1, N^1 - dimetilformamidīns		228–200–5	6164–98–3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50–53	Xn; N R: 21/22–40–50/53 S: (2-)22–36/37–60–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
650–008–00–9	drazoksolons (*ISO*) 4-(2-hlorfenilhidrazon)- 3-metil-5-izoksazolons		227–197–8	5707–69–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-) 22–24–36/37–45–60–61		
650–009–00–4	hlordimeforma hidrogenhlorīds *N* - (4-hlor-o-tolil)-*N*, *N* - dimetilformamidīnmonohidrogenhlorīds N^2 - (4-hlor-o-tolil)-N^1, N^1 - dimetilformamidīnmonohidrogenhlorīds		243–269–1	19750–95–9	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)22–36/37–60–61		
650–033–00–5	esfenvalerāts (*ISO*) (*S*)-α-ciano-3-fenoksibenzil-(*S*)- 2-(4-hlorfenil)-3-metilbutirāts		—	66230–04–4	T; R23/25 R43 N; R50–53	T; N R: 23/25–43–50/53 S: (1/2-)24–36/37/39–45–60–61		
650–041–00–9	triasulfurons (*ISO*) 1-[2-(2-hloretoksi)fenilsulfonil]-3-(4-metoksi-6-metil-l, 3,5-triazīn-2-il)urīnviela		—	82097–50–5	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		

1. D PIELIKUMS

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
006–090–00–8	2-(3-jodprop-2-īn-1-il-oksi)etilfenilkarbamāts		408–010–0	88558–41–2	Xn; R20 Xi; R41 R52–53	Xn R: 20–41–52/53 S: (2-)22–26–39–61		
014–016–00–0	1,3-diheks-5-ēn-l-il-l, l, 3,3-tetrametildisiloksāna un 1,3-diheks-n-ēn-l-il-l, 1,3,3-tetrametildisiloksāna maisījums		406–490–6	—	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
015–164–00–9	kalcija P, P′-(l-hidroksietilēn)*bis* (hidrogēnfosfonāt)dihidrāts		400–480–5	36669–85–9	R52–53	R: 52/53 S: 61		
015–165–00–4	tiobis(4, l-fenilēn)-S, S, S′, S′-tetrafenildi-sulfobisheksafluorfosfāta un difenil(4-feniltiofenil-)sulfo- heksafluorfosfāta maisījums		404–986–7	—	Xi; R41 N; R50–53	Xi; N R: 41–50/53 S: (2-)15–26–39–60–61		
015–166–00-X	3,9-*bis*(2,6-di-*tert* - butil-4-metilfenoksi)-2,4,8,10-tetraoksa-3,9-difosfaspiro[5.5]undekāns		410–290–4	80693–00–1	R53	R: 53 S: 61		
015–167–00–5	3-(hidroksifenilfosfinil)propānskābe		411–200–6	14657–64–8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601–050–00–1	benzola C_{10-13-} alkilatvasinājumi		267–051–0	67774–74–7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601–051–00–7	4-fenilbut-l-ēns		405–980–7	768–56–9	Xi; R38 N; R51–53	Xi; N R: 38–51/53 S: (2-)37-61		
602–083–00–4	difenilēteris, pentabromatvasinājums pentabromdifenilēteris		251–084–2	32534–81–9	Xn; R48/21/22 R64 N; R50–53	Xn; N R: 48/21/22–50/53–64 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
602–084–00-X	1,1-dihlor-1-fluoretāns		404–080–1	1717–00–6	N; R52–53–59	N R: 52/53–59 S: 59-61		
603–128–00–0	2-(fenilmetoksi)naftalīns		405–490–3	613–62–7	R53	R: 53 S: 61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
603–129–00–6	l-*tert* - butoksipropān-2-ols		406–180–0	57018–52–7	R10 Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-)26-39		
603–130–00–1	α-((dimetil)bifenil)-v-hidroksipolioksietilēna izomēru maisījums		406–325–8	—	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)39-61		
603–131–00–7	1-dezoksi-1-[metil-(l -oksododecil)amino]-D-glucitola; 1-dezoksi-1-[metil-(l-oksotetradecil)amino]-D-glucitola maisījums 3:1		407–290–1	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603–132–00–2	2-hidroksimetil-9-metil-6-(l-metiletil)-1,4-dioksaspiro[4.5]dekāns		408–200–3	63187–91–7	Xi; R38–41 R52–53	Xi R: 38–41–52/53 S: (2-)26–37/39–61		
603–133–00–8	3-[(4-amino-2-hlor-5-nitrofenil)amino]-propān-l, 2-diola; 3,3′-(2-hlor-5-nitro-1,4-fenilēndiimino)*bis*(propil-l, 2-diola) maisījums		408–240–1	—	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)22–36–61		
603–134–00–3	Aizvietotu dodecil- un vai tetradecil- difenilēteru maisījums. Vielu iegūst Frīdela-Krafta reakcijā. No reakcijas produkta katalizators ir atdalīts. Difenilēterī aizvietotas ar C1-C10 alkilgrupām. Alkilgrupas izlases veidā saistītas starp C1 un C6. Izmanto lineāras C12 un C14, 50/50.		410–450–3	—	R53	R: 53 S: 61		
603–135–00–9	*bis*[[2,2′, 2”-nitrilotris[etanolato]]-l-N, 0]*bis* [2-(2-metoksietoksi)etoksi]-titāns		410–500–4	—	Xi; R41 N; R51–53	Xi; N R: 41–51/53 S: (2-)26–39–61		
603–136–00–4	3-((4-(*bis*(2-hidroksietil)amino)- 2-nitrofenil)amino)- 1-propanols		410–910–3	104226–19–9	R43 R52–53	Xi R: 43–52/53 S: (2-)24–37–61		
603–137–00-X	1-dezoksi-l-[metil-(l-oksoheksadecil[amino]-D-glucitola; 1-dezoksi-1-[metil-(1-oksooktadecil) amino]-D-glucitola maisījums		411–130–6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
603–138–00–5	3-(2,2-dimetil-3-hidroksipropil)toluols alt: 2,2-dimetil-3-(3-metoksifenil)propanols		403–140–4	103694–68–4	R52–53	R: 52/53 S: 61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
604–050–00-X	4-hlor-o-krezols 4-hlor-2-metilfenols		216–381–3	1570–64–5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23–35–50 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61	C ≥ 25 %:T; C; R23–35 10 % ≤ C < 25 %: C; R20–35 5 % ≤ C < 10 %: C; R20–34 3 % ≤ C < 5 %: Xn; R20–36/37/38 l % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37/38	
604–051–00–5	3,5-*bis*((3,5-di-*tert* - butil-4-hidroksi)benzil)-2,4,6-trimetilfenols		401–110–5	87113–78–8	R52–53	R: 52/53 S: 61		
604–052–00–0	2,2′-metilēn *bis*(6-(2H-benztriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenols		403–800–1	103597–45–1	R53	R: 53 S: 61		
604–053–00–6	2-metil-4-(l, 1-dimetiletil)- 6-(l-metilpentadecil-)fenols		410–760–9	157661–93–3	Xi; R38 R43 N; R50–53	Xi; N R: 38–43–50/53 S: (2-)24-3 7–60–61		
604–054–00–1	2-metoksi-4-(tetrahidro-4-metilēn-2 H-piran-2-il)-fenola; 4-(3,6-dihidro-4-metil-2H-pirān-2-il)-2-metoksifenola maisījums		412–020–0	—	R43 R52–53	Xi R: 43–52/53 S: (2-)24–37–61		
604–055–00–7	2,2′-((3,5′, 5,5′-tetrametil-(1,1′-bifenil)-4,4′-diil)-*bis*(oksimetilēn))-*bis* - oksirāns		413–900–7	85954–11–6	Muta. Cat. 3; R40	Xn R: 40 S: (2-)22–36–37		
605–027–00–7	3a, 4,5,6,7,7a-heksahidro-4,7-metān-lH-indēn-6-karboksaldehīda; 3a, 4,5,6,7,7a-heksahidro-4,7-metān-1H-indēn-5-karboksaldehīda maisījums		410–480–7	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
606–051–00–0	4-pentilcikloheksanons		406–670–4	61203–83–6	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
606–052–00–6	4-(N, N-dibutilamino)-2-hidroksi-2′-karboksibenzofenons		410–410–5	54574–82–2	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–272–00–5	fluoroksipirmeptils (*ISO*) [1] fturoksipirbutometils (*ISO*) [2] metilheptil-O-((4-amino-3,5-dihlor-6-fluor-2-piridiloksi)acetāts [1] 2-butoksi-l-metiletil-O-(4-amino-3,5-dihlor-6-fluor-2-piridiloksi)acetāts [2]		279–752–9 [1] –	81406–37–3 [1] 154486–27–8 [2]	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
607–273–00–0	amonija-7-(2,6-dimetil-8-(2,2-dimetilbutiriloksi)-l, 2,6,7,8,8a-heksahidro-l-naftil)- 3,5-dihidroksiheptānoāts		404–520–2	—	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–274–00–6	2-(N-benzil-N-metilamino)etil-3-amino-2-butēnoāts		405–350–1	54527–73–0	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–275–00–1	nātrija benzoilbenzoksi-4-sulfonāts		405–450–5	66531–87–1	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607–276–00–7	*bis*[(l-metilimidazil)-(2-etilheksānoāts)], cinka komplekss		405–635–0	—	Xi; R38–41 N; R50–53	Xi; N R: 38–41–50/53 S: (2-)26–37/39–60–61		
607–277–00–2	2-(heksiltio)etilamīna hidrogenhlorīda; nātrija propionāta maisījums		405–720–2	—	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51–53	Xn; N R: 22–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
607–278–00–8	nātrija fenetilnaftilsulfonāta; nātrija naftiletil-benzosulfonāta izomēru maisījums		405–760–0	–	Xi; R41 R43 R52–53	Xi R: 41–43–52/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
607–279–00–3	n-oktadecilaminodietil-*bis*(hidrogenmaleāta); n-oktadecilaminodietilhidrogenmaleāta) hidrogenftalāta maisījums		405–960–8	–	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–280–00–9	nātrija 4-hlor-1-hidroksibutān-1-sulfonāts		406–190–5	54322–20–2	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22–36–43 S: (2-)22–26–36/37		
607–281–00–4	Taisnas un sazarotas C7-C9 alkil- 3-[3-(2H-benztriazol-2-il)-5-(l, l-dimetiletil)- 4-hidroksifenil] propionātu maisījums		407–000–3	127519–17–9	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
607–282–00-X	2-acetoksimetil-4-benziloksibut-l-il acetāts		407–140–5	131266–10–9	R52–53	R: 52/53 S:61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
607–283–00–5	E-etil-4-okso-4-fenilkrotonāts		408–040–4	15121–89–8	Xn; R21/22 Xi; R38–41 R43 N; R50–53	Xn; N R: 21/22–38–41–43–50/53 S: (2-)26–36/37/39–60–61		
607–284–00–0	nātrija 3,3′-(1,4-fenilēnbis(karbonilimino-3,1-propildiilimino))*bis*(l0-amino-6,13-dihlor)-4,11-trifenodioksazīndisulfonāta;litija 3,3′-(1,4-fenilēnbis-(karbonilimino-3,1-propildiimino))*bis*(l0-amino-6,13-dihlor)- 4,11-trifenodioksazīndisulfonāta maisījums 9:1		410–040–4	136213–76–8	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
607–285–00–6	7-(((3-aminofenil)sulfonil)amino)-naftil-1,3-disulfonskābes; nātrija 7-(((3-aminofenil) sulfonil)amino)-naftil-1,3-disulfonāta; kālija 7-(((3-aminofenil)sulfonil)amino)-naftil-l, 3-disulfonāta maisījums		410–065–0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–24–37		
607–286–00–1	nātrija/kālija 7-[[[3-[[4-((2-hidroksi-naftil)azo)fenil]azo]fenil]sulfonil]amino]-naftil-1,3-disulfonātu maisījums		410–070–8	141880–36–6	R43 R52–53	Xi R: 43–52/53 S: (2-)22–24–37–61		
607–287–00–7	O′-metil 0-(1 -metil-2-metariloiloksi-etil)-l, 2,3,6-tetrahidroftalāts		410–140–8	—	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–288–00–2	tetranātrija (c-(3-(l-(3-(e-6-dihlor-5-ciano-pirimidīn-f-il(metil)amino)propil)- 1,6-dihidro-2-hidroksi-4-metil-6-okso-3-piridilazo)- 4-sulfonātfenilsulfamil)ftalocianīn-a, b, d-trisulfonāt(6-))niķelāts (II), kur a = 1, 2, 3 vai 4; b = 8, 9 10 vai 11; c = 15, 16, 17 vai 18; d = 22, 23, 24 vai 25, bet e un f attiecīgi ir 2 un 4, vai 4 un 2		410–160–7	148732–74–5	Xi; R36 R43 R52–53	Xi R: 36–43–52/53 S: (2-)22–26–36/37–61		
607–288–00–8	3-(3-(4-(2,4-*bis*(l, 1-dimetilpropil)fenoksi)butilaminokarbonil-4-hidroksi-1-naftil)tio) propionskābe		410–370–9	105488–33–3	R53	R: 53 S: 61		
607–290–00–3	amonija 1-C14-C18-alkiloksikarbonil-2-(3-aliloksi-2-hidroksipropoksikarbonil)etil-1-sulfonāta; amonija 2-C14-C18-alkiloksikarbonil-1-(3-aliloksi-2-hidroksipropoksikarbonil)etil-1-sulfonāta maisījums (dažādās attiecībās)		410–540–2	—	Xi; R38 R43 N; R50–53	Xi; N R: 38–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
607–291–00–9	dodecil-v-(C5/C6-cikloalkil)alkil karboksilāts		410–630–1	104051–92–5	R53	R: 53 S: 61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
607–292–00–4	[l-(metoksimetil)-2-(C12-alkoksi)-etoksi]etiķskābes; [1-(metoksimetil)- 2-(C14-alkoksi)-etoksi]etiķskābes maisījums		410–640–6	—	Xi; R38–41 N; R50–53	Xi; N R: 38–41–50/53 S: (2-)26–37/39–60–61		
607-29 3–00-X	N-aminoetilpiperazonija mono-2,4,6-trimetilnonildifenilētera disulfonāta; N-aminoetilpiperazonija di-2,4,6-trimetilnonildifenilētera disulfonāta maisījums		410–650–0	—	Xi; R41 R43 N; R51–53	Xi; N R: 41–43–51/53 S: (2-)26–36/37/39–61		
607–294–00–5	nātrija 2-benzoiloksi-1-hidroksietānsulfonāts		410–680–4	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607–295–00–0	tetranātrija fosfonetān-1,2-dikarboksilāta; heksanātrija fosfonbutān-1,2,3,4-tetrakarboksilāta maisījums		410–800–5	—	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–296–00–6	pentānitrioltetraesteru maisījums ar heptānskābi un 2-etilheksānskābi		410–830–9	—	R53	R: 53 S: 61		
607–297–00–1	(E-E)-3,3′-(1,4-fenilēndimetilidēn)*bis*(2-oksobornān-l0-sulfoskābe)		410–960–6	92761–26–7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607–298–00–7	2-(trimetilammonija)etoksikarboksibenzil-4-sulfonāts		411–010–3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–36/37		
607–299–00–2	metil 3-(acetiltio)- 2-metilpropānoāts		411–040–7	97101–46–7	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
607–300–00–6	trinātrija [2-(5-hlor-2,6-difluorpirimidīn-4-ilamino)- 5-(b-sulfanil-c, d-sulfonātftalocianīn-a-il-K4, N29, N30, N31, N32-sulfanilamino) benzoāt(5-)]kuprāts(II) kur a = 1, 2, 3, 4; b = 8, 9, 10, 11; c = 15, 16, 17, 18; d = 22, 23, 24, 25		411–430–7	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–24–37		
607–301–00–1	dodekanoilskābes; dodekanoilskābes poli(l-7) laktonu maisījums		411–860–5	—	Xi; R38–41 R43 N; R51–53	Xi; N R: 38–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
607–302–00–7	tetradekanoilskābes; tetradekanoilskābes poli(l-7) laktonu maisījums		411–910–6	—	Xi; R38–41 R43 N; R51–53	Xi; N R: 38–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
607–303–00–2	1-ciklopropil-6,7-difluor-l, 4-dihidro-4-oksohinolīn-3-karbonskābe		413–760–7	93107–30–3	Repr. Cat. 3; R62 R52–53	Xn R: 62–52/53 S: (2-)22–36/37–61		
608–023–00–3	4-(4-hlorfenil)-2-fenil-2-[(lH-l, 2,4-triazol-1-il) metil]butilnitrils		406–140–2	114369–43–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
608–024–00–9	2-(4-(N-butil-N-fenetilamino)fenil)etilēn-1,1,2-trikarbonitrils		407–650–8	97460–76–9	R53	R: 53 S: 61		
608–025–00–4	2-nitro-4,5-*bis*(benziloksi)fenilacetonitrils		410–970–0	117568–27–1	R53	R: 53 S: 61		
609-05 3–00-X	hidrazīntrinitrometāns		414–850–9	—	E; R3 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/25 R43	E; T R: 45–3–8–23/25–43 S: 53-45		
610–010–00–2	2-brom-1-(2-furil)- 2-nitroetilēns		406–110–9	35950–52–8	Xn; R22–48/22 C; R34 R43 N; R50–53	C; N R: 22–34–43–48/22–50/53 S: (1/2-)22–26–36/37/39–45–60–61		
611–043–00–5	trinātrija N(1′)-N(2):N(1‴)N(2″)-η– 6-[2-amino-4-(vai 6)-hidroksi-(vai 4-amino-2-hidroksi)fenazo]- 6″-(l-karbaniloil-2-hidroksiprop-l-ēnilazo)- 5′, 5‴-disulfanil-3,3″-disulfonātbis(naftil-2,1-azobenzil-l, 2′-diolato-O(l), O(2′))-hromāta;trinātrija N(1′)-N(2):N(1‴)N(2″)-η– 6,6″-*bis*(l–karbaniloil-2-hidroksiprop-1-ēnilazo)- 5, ′5‴-disulfanil-3,3″-disulfonātbis (naftil-2,1′-azobenzil-l, 2′-diolato-O(l), O(2′))-hromāta;trinātrija N(1′)-N(2):N(1‴)N(2″)-η– 6,6″-*bis*[2-amino-4-(vai 6)-hidroksi-(vai 4-amino-2-hidroksi)fenazo]5′, 5‴-disulfanil-3,3″-disulfonātbis(naftil-2, lazobenzil-l, 2′-diolato-O(l), O(2′))-hromāta maisījums 2:1:1		402–850–1		Xi; R41 R52–53	Xi R: 41–52/53 S: (2-)26–39–61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
611–044–00–0	tert-alkil(C12-C14)amonija *bis*[l-[(2-hidroksi-5-nitrofen)azo]- 2-naftalenolato(2-)]-hromāta(l -); *tert* - alkil (Cl2-C14) amonija *bis*[l-[(2-hidroksi-4-nitrofen)azo]- 2-naftalenolato(2-)]-hromata(l-); *tert* - alkil(Cl2-C14)amonija *bis*[l -[[5-(1,1–dimetilpropil)- 2-hidroksi-3-nitrofen]azo]- 2-naftalenolato(2-)]-hromāta(l-);*tert* - alkil(Cl2-C14)amonija-[[1-[(2-hidroksi-5-nitrofen)azo]-2-naftalenolato(2-)]-[l-[(2-hidroksi-5-nitrofn)azo]-2-naftalenolato(2-)]]-hromāta(l-);*tert* - alkil(Cl2-C14) amonija-[[l -[[5-< 1,1-di-metilpropil)- 2-hidroksi-3-nitrofen]azo] - 2-naftalenolato(2-)]-[l-[(2-hidroksi-5-nitrofen)azo]- 2-naftalenolato(2-)]]-hromāta (1-);*tert* - alkil(Cl2-C14) amonija((l -(4(vai 5)-nitro-2-oksidofenazo)-2-naftolato)(1-(3-nitro-2-oksido-5-pentilfenazo)- 2-naftolato))hromāta(l-) maisījums		403–720–7	117527–94–3	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
611–045–00–6	2-[4-[N-(4-acetoksibutil)-N-etil]amino-2-metilfenazo]- 3-acetil-5-nitrotiofēns		404–830–8	—	R53	R: 53 S: 61		
611–046–00–1	4,4′-diamino-2-metilazobenzols		407–590–2	43151–99–1	T;R25 Xn; R48/22 R43 N; R50–53	T; N R: 25–43–48/22–50/53 S: (1/2-)22–28–36/37–45–60–61		
611–047–00–7	2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]-5,6-dihlorbenztiazola; 2-[[4-[N-etil-N-(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]- 6,7-dihlorbenztiazola maisījums 1:1		407–890–3	111381–11–4	R53	R: 53 S: 61		
611–048–00–2	2-[[4-[*bis*(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]- 5,6-dihlorbenztiazola;2-[[4-[*bis*(2-acetoksietil)amino]fenil]azo]- 6,7-dihlorbenztiazola maisījums 1:1		407–900–6	111381–12–5	R53	R: 53 S: 61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
611–049–00–8	7-[4-(3-dietilaminopropilamino)-6-(3-dietilamonijpropilamino)- 1,3,5-triazīn-2-ilamino]- 4-hidroksi-3-(4-fenazofenilazo)-naftalīn-2-sulfonāts, etiķskābe, pienskābe (2:1:1)		408–000–6	118658–98–3	Xn; R48/22 R43 R52–53	Xn R: 43–48/22–52/53 S: (2-(22–36/37–61		
611–051–00–9	2-(4-(N-etil-N-(2-hidroksi)etil)amino-2-metilfenil)azo-6-metoksi-3-metilbenztiazolija hlorīds		411–110–7	136213–74–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
611–052–00–4	nātrija akva-[5-[[2,4-dihidroksi-5-[(2-hidroksi-3,5-dinitrofen)azo]fenil]azo]- 2-naftilnsulfonāts], dzelzs komplekss		400–720–9	—	R52–53	R: 52/53 S: 61		
612–156–00–2	triheksadecilmetilamonija hlorīda; diheksadecildimetilamonija hlorīda maisījums		405–620–9	—	Xi; R41 N; R50–53	Xi; N R: 41–50/53 S: (2-)26–39–60–61		
612–157–00–8	(Z)- 1-benz[b]tiēn-2-iletanona oksīma hidrohlorīds		410–780–8	—	Xn; R22–48/22 Xi; R41 R43 N; R51–53	Xn; N R: 22–41–43–48/22–51/53 S: (2-)22–26–36/37/39–61		
612–158–00–3	vara (II) bis(5-dodecil-2-hidroksibenzaldoksimāta) C12-alkilgrupa sazarota; 4-dodecilsalicilaldoksīma maisījums		410–820–4	—	R53	R: 53 S: 61		
612–159–00–9	trimetilheksametilēndiamīna (2,2,4-trimetil-l, 6-heksāndiamīna un 2,4,4-trimetil-1,6-heksāndiamīna maisījuma, iekļauts *EINECS*), Epoksīda 8 (mono[(Cl0-C16-alkiloksi)metil]oksirāna atvasinājumu) un p-toluilsulfoskābes reakcijas produkti		410–880–1	—	Xn; R22 C; R34 N; R50–53	C; N R: 22–34–50/53 S: (1/2-)23–26–36/37/39–45–60–61		
613–149–00–7	2-*tert* - butil-5-(4-*tert* - butilbenziltio)- 4-hlorpiridazīn-3(2H)-ons		405–700–3	96489–71–3	T; R23/25 N; R50–53	T; N R: 23/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
613–150–00–2	2,2′-[3,3′-(piperazīn-1,4-diil)dipropil]*bis*(lH-benzimidazo[2, l-b]benzo[l, m, n][3,8]fenantrolīn-1,3,6-trions		406–295–6	—	R53	R: 53 S: 61		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
613–151–00–8	1-(3-meziloksi-5-tritiloksimetil-2-D-treofuril)timīns		406–360–9	104218–44–2	R53	R: 53 S: 61		
613–152–00–3	fenil-N-(4,6-dimetoksipirimidīn-2-il)karbamāts		406–600–2	89392–03–0	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
613–153–00–9	2,3,5-trihlorpiridīns		407–270–2	16063–70–0	R52–53	R: 52/53 S: 61		
613–154–00–4	2-amino-4-hlor-6-metoksipirimidīns		410–050–9	5734–64–5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613–155–00-X	5-hlor-2,3-difluorpiridīns		410–090–7	89402–43–7	R10 Xn; R22 R52–53	Xn R: 10–22–52/53 S: (2-)23–36–61		
613–156–00–5	2-butil-4-hlor-5-formilimidazols		410–260–0	83857–96–9	R43 N; R51–53	Xi; N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
613–157–00–0	2,4-diamino-5-metoksimetilpirimidīns		410–330–0	54236–98–5	Xn; R22–48/22 Xi; R36	Xn R: 22–36–48/22 S: (2-)22–26–36		
613–158–00–6	2,3-dihlor-5-trifluormetilpiridīns		410–340–5	69045–84–7	Xn; R20/22 Xi; R41 R43 N; R51–53	Xn; N R: 20/22–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		
613–159–00–1	4-[2-[4-(1,1 -dimetiletil)fenil]-etoksi]hinazolīns		410–580–0	120928–09–8	T; R25 Xn; R20 N; R50–53	T; N R: 20–25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
613–160–00–7	(1S)- 2-metil-2,5-diazobiciklo[2.2.1]heptil-dihidrobromīds		411–000–9	125224–62–6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615–022–00–1	metil-3-izocianatosulfanil-2-tiofēnkarboksilāts		410–550–7	79277–18–2	E; R2 R14 Xn; R48/22 R42/43	E; Xn R: 2–14–42/43–48/22 S: (2-)22–30–35–36/37		

Indeksa Nr.	Ķīmiskais nosaukums	Piezīmes par vielu	EK Nr.	CAS Nr.	Klasifikācija	Marķējums	Robežkoncentrācija	Piezīmes par preparātu
615–023–00–7	2-(izocianosulfanilmetil)benzoskābes metilesteris; (alt.): metil-2-(izocianosulfanilmetil) benzoāts		410–900–9	83056–32–0	R10 R14 Muta. Cat. 3; R40 Xn; R20–48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10–14–20–40–41–42–48/22 S: (2-)23–26–36/37/39		
616–044–00–4	N-(3,5-dihlor-4-etil-2-hidroksifenil)- 2-(3-pentadecilfenoksi)-butānamīds		402–510–2	—	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
616–045–00-X	2′-(4-hlor-3-ciano-5-formil-2-tienilazo)-5′-dietilamino-2-metoksiacetanilīds		405–190–2	122371–93–1	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22–24–37–61		
616–046–00–5	N-(2-(6-hlor-7-metilpirazolo(l, 5-b)-1,2,4-triazol-4-il)propil)-2-(2,4-di-*tert* — pentilfenoksi)oktānamīds		406–390–2	—	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
616–047–00–0	2,2′, 2”, 2‴-(etilidēndinitrilotetrakis-N, N-di(C16)alkilacetamīda; 2,2′, 2”, 2‴-(etilidēndinitrilotetrakis-N, N-di(C18)alkilacetamīda maisījums		406–640–0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
616–048–00–6	3′-trifluormetilizobutiranilīds		406–740–4	1939–27–1	Xn; R48/22 N; R51–53	Xn; N R: 48/22–51/53 S: (2-)22–36–61		
616–049–00–1	2-(2,4-*bis*(l, 1-dimetiletil)fenoksi)-N-(3,5-dihlor-4-etil-2-hidroksifenil)-heksānamīds		408–150–2	99141–89–6	R53	R: 53 S: 61		
616–050–00–7	N-[2,5-dihlor-4-(l, 1,2,3,3,3-heksafluorpropoksi)-fenilaminokarbonil]- 2,6-difluorbenzamīds		410–690–9	103055–07–8	R43 N; R50–53	Xi; N R: 43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
616–051–00–2	2,4-*bis*(N′-(4-metilfenil)-ureido)-toluola; 2,6-*bis*(N′-(4-metilfenil)-ureido)-toluola maisījums		411–070–0	—	R53	R: 53 S: 61		
617–015–00–9	*bis*(4-metilbenzoil)peroksīds		407–950–9	895–85–2	E;R20 R7 N; R50–53	E; N R: 2–7–50/53 S: (2-)7–14–36/37/39–47–60–61		
650–032–00-X	ciprokonazols (*ISO*) (2RS, 3RS;2RS, 3SR)- 2-(4-hlorfenil)- 3-ciklopropil-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butān-2-ols		—	94361–06–5	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–50/53–63 S: (2-)36/37–60–61		

2. PIELIKUMS

Sk. Komisijas Direktīvu 2001/59/EK, OV L 225, 21.8.2001., 1. lpp.

3. A PIELIKUMS

Sk. Komisijas Direktīvu 2001/59/EK, OV L 225, 21.8.2001., 1. lpp.

3. B PIELIKUMS

Sk. Komisijas Direktīvu 2001/59/EK, OV L 225, 21.8.2001., 1. lpp.

4. A PIELIKUMS

"B.10. MUTAGENITĀTE — ZĪDĪTĀJU HROMOSOMU IZMAIŅU TESTS *IN VITRO*

1. METODE

Šī metode ir ESAO TG 473 metodes "Zīdītāju hromosomu izmaiņu tests *in vitro*" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Pēc hromosomu izmaiņu testa *in vitro* nosaka vielas, kas zīdītāju šūnu kultūrās rada hromosomu struktūras izmaiņas (1) (2) (3). Struktūras izmaiņas var būt divu veidu — hromosomu izmaiņas vai hromatīdu izmaiņas. Lielākā daļa ķīmisko mutagēnu izraisa hromatīdu izmaiņas, tomēr notiek arī hromosomu izmaiņas. Poliploīdijas palielināšanās var liecināt, ka ķīmiskā viela, iespējams, rada hromosomu skaita izmaiņas. Taču šī metode nav paredzēta šādu izmaiņu noteikšanai šūnās, un parasti to tādām vajadzībām neizmanto. Hromosomu mutācijas un ar tām saistītās ģenētiskās pārmaiņas ir daudzu cilvēka ģenētisko slimību cēlonis, turklāt ir pierādīts, ka hromosomu mutācijas un ar tām saistītās pārmaiņas somatiskajās šūnās rada onkogēnu un tumorsupresoro gēnu izmaiņas, izraisot vēzi cilvēkiem un izmēģinājumu dzīvniekiem.

Hromosomu izmaiņu testam *in vitro* var izmantot izveidotas šūnu līnijas, šūnu celmus vai primāro šūnu kultūras. Testam izmantojamās šūnas izvēlas pēc to augšanas spējām kultūrā, kariotipa stabilitātes, hromosomu skaita, hromosomu daudzveidības un hromosomu spontāno izmaiņu biežuma.

Testiem, ko izdara *in vitro*, metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēns avots. Šāda metaboliskas aktivācijas sistēma nevar pilnībā imitēt apstākļus zīdītāju organismā *in vivo*. Būtu jāpievērš uzmanība tam, lai testa laikā novērstu apstākļus, kuros iegūtie pozitīvie rezultāti neliecina par testa vielām piemītošo mutagenitāti, bet kuru cēlonis ir vides pH izmaiņas, osmoze vai paaugstināta citotoksicitāte (4) (5).

Šo testu izmanto zīdītājiem potenciāli mutagēnu un kancerogēnu vielu skrīningam. Daudzi savienojumi, kam šis tests ir pozitīvs, ir zīdītājiem kancerogēni; tomēr pilnīgas šā testa pozitīva rezultāta korelācijas ar vielas kancerogēnajām īpašībām nav. Korelācija atkarīga no ķimikāliju grupas, pie kuras pieder testa viela, un kļūst skaidrs, ka ar šo testu neatklāj tādus kancerogēnus, kuri tieši nebojā DNS, bet kuriem piemīt cita veida kaitīgā iedarbība.

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Hromatīdu tipa izmaiņas: hromosomas struktūras bojājumi, kas izpaužas kā viena hromatīda pārrāvums vai hromatīda pārrāvums un tā rekombinācija.

Hromatīdu tipa izmaiņas: hromosomas struktūras bojājumi, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un rekombinācija vienā un tajā pašā vietā.

Endoreduplikācija: process, kurā pēc DNS replikācijas S perioda nenotiek šūnas kodola mitoze, bet sākas nākamais S periods. Rezultātā izveidojas hromosomas ar 4, 8, 16,… hromatīdiem.

Pārrāvums: ahromatisks bojājums ar nelielu hromatīdu nobīdi, kas ir mazāka par viena hromatīda platumu.

Mitotiskais indekss: metafāzē esošu šūnu skaita attiecība pret šūnu kopējo skaitu populācijā; raksturo šūnu populācijas vairošanās spēju.

Hromosomu skaita izmaiņas: testam izmantojamajām šūnām raksturīgā parastā hromosomu skaita izmaiņas.

Poliploīds hromosomu skaits: haploīda hromosomu skaita (n) daudzkārtnis, izņemot hromosomu diploīdu skaitu (t.i., 3n, 4n utt).

Struktūras izmaiņas: hromosomu struktūras izmaiņas, kas redzamas mikroskopā šūnu dalīšanās metafāzē, ko novēro kā trūkstošus posmus, fragmentus, iekšējas vai savstarpējas rekombinācijas.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Šūnas pakļauj testa vielas iedarbībai gan ar metabolisku aktivāciju, gan bez tās. Noteiktos laika intervālos pēc testa vielas iedarbības uz šūnu kultūrām, tās apstrādā ar kādu metafāzi apturošu vielu (piemēram, *Colcemid*® vai kolhicīnu), šūnas metafāzē savāc, iekrāso un mikroskopiski analizē hromosomu izmaiņas.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošana**

1.4.1.1. *Šūnas*

Var izmantot dažādas šūnu līnijas, celmus vai primārās šūnu kultūras (piemēram, Ķīnas kāmju fibroblastus, cilvēku un citu zīdītāju perifēro asiņu limfocītus).

1.4.1.2. *Barotnes un kultivēšanas apstākļi*

Kultūru uzturēšanai lieto piemērotas barotnes un ievēro atbilstošus kultivēšanas apstākļus (trauki kultūrām, CO_2 koncentrācija, temperatūra un mitrums). Stabilām šūnu līnijām un celmiem pārbauda hromosomu skaita stabilitāti un mikoplazmas radīto piesārņojumu; piesārņotas šūnu kultūras neizmanto. Jābūt zināmam šūnu cikla ilgumam un šūnu kultivēšanas apstākļiem.

1.4.1.3. *Kultūru sagatavošana*

Stabilas šūnu līnijas un celmi: šūnas pavairo no kultūru krājumiem, ko izsēj barotnē ar tādu blīvumu, lai līdz novākšanas laikam šūnu kultūras nesaplūstu, un inkubē 37 °C temperatūrā.

Limfocīti: ar antikoagulantu (piemēram, heparīnu) apstrādātas asinis vai izdalītus limfocītus, kas iegūti no veseliem indivīdiem, pievieno barotnei, kura satur mitogēnu (piemēram, fitohemaglutinīnu), un inkubē 37 °C temperatūrā.

1.4.1.4. *Metabolisma aktivācija*

Šūnas pakļauj testa vielas iedarbībai gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Plašāk izmantojamā aktivācijas sistēma ir ar kofaktoru papildināta pēcmitohondriskā frakcija (S9), ko pagatavo no grauzēju aknām, kas apstrādātas ar enzīmstimulējošām vielām, piemēram, *Aroclor* 1254 (6) (7) (8) (9) vai fenobarbitona un β-naftoflavona maisījumu (10) (11) (12).

Pēcmitahondrālo frakciju parasti izmanto pēdējā testa barotnē koncentrācijā no 1-10 tilp. %. Metabolisma aktivācijas sistēmas stāvoklis var būt atkarīgs no ķimikāliju grupas, pie kuras pieder testa viela. Dažos gadījumos pēcmitohondriskā frakcija var būt jālieto vairākās koncentrācijās.

Endogēnai aktivācijai var izmantot dažādus paņēmienus, arī ar gēnu inženierijas metodēm iegūtas šūnu līnijas, kas izdala īpašus aktivācijas enzīmus. Izmantojamo šūnu līniju izvēlei jābūt zinātniski pamatotai (piemēram, ar citohroma P450 izoenzīma nepieciešamību testa vielas metabolismam).

1.4.1.5. *Testa viela/preparāts*

Pirms šūnu apstrādes ar cietām testa vielām, tās vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos, un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var tieši pievienot testa sistēmās un/vai pirms šūnu apstrādes atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti rāda, ka tos uzglabāt nevar, pārbaudēm izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

1.4.2. **Testa apstākļi**

1.4.2.1. *Šķīdinātājs/nesējs*

Šķīdinātājs vai nesējs nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu, un tam jābūt saderīgam ar šūnu dzīvotspēju un S9 aktivitāti. Izmantojot kādus citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, ieteicams vispirms izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus. Pārbaudot ūdens vidē nestabilas vielas, izmanto bezūdens organiskos šķīdinātājus. Ūdeni var atdalīt, pievienojot molekulāros sietus.

1.4.2.2. *Pārbaudāmās koncentrācijas*

Starp kritērijiem, kas jāņem vērā, nosakot testa vielas lielāko koncentrāciju, ir tās citotoksicitāte, šķīdība testa sistēmā, kā arī ietekme uz pH izmaiņām un osmoze.

Citotoksicitāti nosaka galvenajā eksperimentā ar metabolisma aktivāciju un bez tās, izmantojot piemērotus šūnu integritātes un augšanas rādītājus, piemēram, saplūšanas pakāpi, dzīvotspējīgo šūnu skaitu vai mitotisko indeksu. Var būt lietderīgi iepriekšējā eksperimentā noteikt vielas citotoksicitāti un šķīdību.

Būtu jāizmanto vismaz trīs analizējamas koncentrācijas. Ja viela ir citotoksiska, koncentrāciju intervālā jāietver maksimāli toksiskās koncentrācijas, kā arī vielas maztoksiskās vai netoksiskās koncentrācijas; parasti koncentrācijām vajadzētu atšķirties ne vairāk kā 2 līdz 10 reizes. Šūnu novākšanas laikā pie lielākās koncentrācijas vajadzētu būt novērojamam būtiskam saplūšanas pakāpes, dzīvotspējīgo šūnu skaita un mitotiskā indeksa samazinājumam (vairāk nekā par 50 %). Mitotiskais indekss citotoksisko vai citostatisko iedarbību raksturo tikai netieši un ir atkarīgs no laika, kas pagājis pēc šūnu apstrādes ar testa vielu. Tomēr mitotiskā indeksa izmantošana ir pieņemama suspensiju kultūrām, kurās citu toksicitāti raksturojošu rādītāju noteikšana var būt apgrūtināta vai pat neiespējama. Kā papildus informāciju var izmantot datus par šūnas cikla kinētiku, piemēram, vidējo ģenerācijas ilgumu (*AGT*), lai gan tas ir kopējais vidējais rādītājs, kas ne vienmēr liecina par aizkavētu apakšpopulāciju pastāvēšanu, turklāt pat pavisam neliela vidējā ģenerācijas ilguma palielināšanās var būt saistīta ar būtisku tā laika aizturi, pēc kura optimāli novērojamas hromosomu izmaiņas.

Vielām ar relatīvi nelielu citotoksicitāti maksimālajai testa koncentrācijai vajadzētu būt 5 µl/ml, 5 mg/ml vai 0,01 M, no kurām izvēlas mazāko.

Relatīvi nešķīstošām vielām, kuras nav toksiskas koncentrācijās, kas mazākas par piesātināta šķīduma koncentrāciju, lielākajai pārbaudāmajai devai vajadzētu būt tādai koncentrācijai, kas pārsniedz šķīdības robežu galīgās kultūras barotnē apstrādes perioda beigās. Dažkārt (piemēram, gadījumos, kad viela ir toksiska tikai koncentrācijās, kas pārsniedz piesātināta šķīduma koncentrāciju) ieteicams testam izmantot vielas vairākas koncentrācijas, pie kurām novērojama tās izgulsnēšanās. Var būt lietderīgi novērtēt vielas šķīdību tās apstrādes sākumā un beigās, jo testa sistēmā šķīdība var mainīties šūnu, S9 seruma un citu faktoru ietekmē. Neizšķīdušas vielas klātbūtni var noteikt vizuāli. Neizšķīdušas vielas klātbūtne nedrīkst traucēt skaitīšanu.

1.4.2.3. *Negatīvas un pozitīvas kontroles*

Katrā eksperimentā gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās vienlaicīgi iekļauj pozitīvu un negatīvu (šķīdinātāja vai nesēja) kontroli. Izmantojot metabolisma aktivāciju, pozitīvai kontrolei izvēlas vielu, kuras mutagēnai iedarbībai ir vajadzīga aktivācija.

Pozitīvai kontrolei izmanto zināmu elastogēnu koncentrācijās, kuras dod reproducējamu un nosakāmu palielinājumu virs fona līmeņa, kas skaidri parāda testa sistēmas jutību.

Pozitīvās kontroles vielu koncentrācijas izvēlas tā, lai to iedarbība būtu skaidri redzama, tomēr kodēto priekšmetstikliņu identitāti to nolasītājs nevarētu konstatēt uzreiz. Pie pozitīvās kontroles vielām pieder:

Metabolisma aktivācijas apstākļi	Viela	CAS Nr.	Einecs N.
Bez eksogēnas metabolisma aktivācijas	metilmetānsulfonāts	66–27–3	200–625–0
	etilmetānsulfonāts	62–50–0	200–536–7
	nitrozoetilurīnviela	759–73–9	212–072–2
	mitomicīns C	50–07–7	200–008–6
	4-nitrohinolīn-N-oksīds	56–57–5	200–281–1
Ar eksogēnu metabolisma aktivāciju	benozpirēns	50–32–8	200–028–5
	ciklofosfamīds	50–18–0	200–015–4
	ciklofosfamīda monohidrāts	6055–19–2	

Pozitīvai kontrolei var izmantot arī citas piemērotas vielas. Ja iespējams, pozitīvai kontrolei izmanto savienojumus, kas pieder pie atbilstošām vielu grupām.

Negatīvu kontroli, kur apstrādes barotnē ietilpst tikai šķīdinātājs vai nesējs, iekļauj visās šūnu novākšanas reizēs, un ar to rīkojas tieši tāpat, kā ar apstrādes kultūrām. Turklāt jāizmanto arī tukšos mēģinājumus, izņemot gadījumus, kad ir iepriekš iegūti vēsturiski kontroldati, kas skaidri parāda, ka izvēlētajam šķīdinātājam nav kaitīgas mutagēnas iedarbības.

1.4.3. **Procedūra**

1.4.3.1. *Iedarbība ar testa vielu*

Šūnas, kas vairojas, apstrādā ar testa vielu gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Limfocītus apstrādā aptuveni 48 stundas pēc mitozes stimulācijas.

1.4.3.2. Dublikātu kultūras parasti izmanto visām koncentrācijām, un tās noteikti jāizmanto negatīvas/šķīdinātāja kontroles kultūrām. Ja iepriekš iegūtie vēsturiskie dati liecina, ka dublikātu kultūru atšķirības ir minimālas (13) (14), pie katras koncentrācijas var izmantot tikai vienu kultūru.

Gāzveida vai gaistošu vielu pārbaudēm jāizmanto atbilstošas metodes, piemēram, kultivēšana hermētiski noslēgtos traukos (15) (16).

1.4.3.3. *Kultūru novākšanas laiks*

Pirmajā eksperimentā šūnas 3-6 stundas pakļauj testa vielas iedarbībai gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās, un ņem paraugu pēc laika perioda, kas atbilst aptuveni 1,5 normāliem šūnas cikliem pēc apstrādes sākuma (12). Ja šādi iegūst negatīvus rezultātus gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās, izdara papildu eksperimentu bez aktivācijas, ar testa vielu nepārtraukti apstrādājot kultūru līdz parauga ņemšanai, ko veic pēc laika perioda, kas atbilst aptuveni 1,5 normāliem šūnas cikliem. Dažas ķīmiskas vielas var labāk noteikt, ja to apstrādes/paraugu ņemšanas laiks ir ilgāks par 1,5 šūnas cikliem. Negatīvi rezultāti, kas iegūti ar metabolisma aktivāciju, katrā konkrētā gadījumā ir jāapstiprina. Gadījumos, kad negatīvu rezultātu apstiprināšanu uzskata par nevajadzīgu, tas ir jāpamato.

1.4.3.4. *Hromosomu sagatavošana*

Šūnu kultūras 1-3 stundas pirms novākšanas apstrādā ar *Colcemid*® vai kolhicīnu. Hromosomu preparēšanai paredzētās šūnu kultūras novāc un apstrādā katru atsevišķi. Hromosomu preparēšana ietver šūnu hipotonisku apstrādi, fiksāciju un iekrāsošanu.

1.4.3.5. *Analīze*

Visus priekšmetstikliņus, arī pozitīvas un negatīvas kontroles priekšmetstikliņus, pirms mikroskopiskās analīzes kodē. Tā kā fiksācijā bieži tiek bojātas metafāzes šūnas, zaudējot hromosomas, uzskaitāmajās šūnās jābūt centromēru skaitam, kas vienāds ar modālo skaitli ≠ 2 visiem šūnu tipiem. Uz katru koncentrāciju un kontroli jāuzskaita vismaz 200 labi sadalījušās metafāzes, ko sadala līdzīgās daļās starp dublikātiem gadījumos, kad tos izmanto. Šo skaitli var samazināt gadījumos, kad novēro lielu skaitu izmaiņu.

Tā kā testa mērķis ir noteikt hromosomu struktūras izmaiņas, ir jāatzīmē poliploīdija un endoreduplikācija gadījumos, kad šīs parādības tiek novērotas.

2. DATI

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Eksperimenta vienība ir šūna, tāpēc jānovērtē to šūnu daļa, kurās radušās hromosomu struktūras izmaiņas. Uzskaita dažāda veida hromosomu struktūras izmaiņas, norādot to skaitu un biežumu gan eksperimentālajām, gan kontrolei izmantojamajām kultūrām. Pārrāvumus uzskaita un norāda atsevišķi, bet kopējā izmaiņu biežumā tos parasti neiekļauj.

Norāda arī vienlaicīgi veiktos pasākumus citotoksiskuma novēršanai visām apstrādātajām un negatīvas kontroles kultūrām, ko izmanto galvenajam izmaiņu noteikšanas eksperimentam.

Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Bez tam visus datus apkopo tabulas veidā.

Attiecībā uz pozitīvas reakcijas verificēšanu nav noteiktu prasību. Apšaubāmus rezultātus pārbauda, veicot atkārtotu pārbaudi, turklāt papildu testiem vēlams mainīt eksperimenta apstākļus. Negatīvu rezultātu apstiprināšana aprakstīta 1.4.3.3. punktā. Eksperimenta apstākļu parametru izmaiņas novērtē un nosaka kontroles eksperimentos. Eksperimenta parametri, kurus var mainīt, ir pārbaudāmo koncentrāciju atšķirības un metabolisma aktivācijas apstākļi.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvu rezultātu nosaka pēc vairākiem kritērijiem, pie kuriem pieder tādi rādītāji, kā ar koncentrācijas izmaiņām saistītā to šūnu skaita vai reproducējamā skaita palielināšanās, kurās ir hromosomu izmaiņas. Vispirms rezultātus izvērtē bioloģiski. Kā palīglīdzekli pārbaužu rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes (3) (13). Statistiskais nozīmīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju.

Poliploīdo šūnu skaita palielināšanās var norādīt uz to, ka testa viela, iespējams, kavē mitotiskos procesus un rada hromosomu skaita izmaiņas. Tādu šūnu skaita palielināšanās, kurās ir endoreduplicētas hromosomas, var norādīt uz to, ka testa viela, iespējams, kavē šūnu cikla attīstību (17) (18).

Uzskata, ka testa viela šajā sistēmā nav mutagēna, ja tās pārbaudes rezultāti neatbilst iepriekšminētajiem kritērijiem.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst skaidri pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Zīdītāju hromosomu izmaiņu testā *in vitro* iegūti pozitīvi rezultāti liecina, ka testa viela rada zīdītāju somatisko šūnu hromosomu struktūras izmaiņas. Negatīvi rezultāti norāda, ka testa apstākļos testa viela nerada zīdītāju somatisko šūnu hromosomu struktūras izmaiņas.

3. **ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA**

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai:

Šķīdinātājs/nesējs:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Šūnas:

— šūnu veids un izcelsme,

— izmantoto šūnu kariotipa īpatnības un piemērotība,

— mikoplazmas trūkums, gadījumos, kad tas vajadzīgs,

— dati par šūnas cikla ilgumu,

— asinsdonoru dzimums; nesadalītas asinis vai atdalīti limfocīti; izmantotais mitogēns,

— pārneses reižu skaits, ja vajadzīgs,

— šūnu kultūru uzturēšanas metode, ja vajadzīgs,

— hromosomu modālais skaits.

Testa apstākļi:

— metafāzes apturēšanai izmantojamās vielas identifikācija, tās koncentrācija un šūnu apstrādes ilgums,

— vielas koncentrāciju un šūnu kultūru skaita izvēles pamatojums, piemēram, dati par citotoksicitāti un šķīdības robežām, ja tie ir pieejami,

— barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija gadījumos, kad to izmanto,

— testa vielas koncentrācija,

— pievienotā nesēja un testa vielas tilpums,

— inkubēšanas temperatūra,

— inkubēšanas ilgums,

— apstrādes ilgums,

— šūnu blīvums to izsējas laikā, gadījumos, kad tas jānorāda,

— metabolisma aktivācijas sistēmas veids un sastāvs, norādot pieņemamības kritērijus,

— pozitīvas un negatīvas kontroles,

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,

— izmaiņu uzskaites kritēriji,

— analizēto metafāžu skaits,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti:

— toksicitātes pazīmes, piemēram, saplūšanas pakāpe, dati par šūnas ciklu, šūnu skaitu, mitotisko indeksu,

— izgulsnēšanās pazīmes,

— dati par apstrādes barotnes pH un osmozi, ja tie noteikti,

— izmaiņu veids, ieskaitot pārrāvumus,

— to šūnu skaits, kurās ir hromosomu izmaiņas un izmaiņu veids, ko atsevišķi norāda kultūrām, ko apstrādā ar testa vielu, un kontrolei izmantotajām kultūrām,

— ploīdijas izmaiņas, ja tās tiek novērotas,

— ja iespējams, devas un reakcijas attiecības,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— līdztekus iegūtie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti,

— līdzšinējie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējo lielumu un standartnovirzes.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES:**

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

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

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

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

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

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

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

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Mircrosomal System In Vitro, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, Mutation Res., 37, pp. 83-90.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. B PIELIKUMS

"B.11. MUTAGENITĀTE — ZĪDĪTĀJU KAULU SMADZEŅU HROMOSOMU IZMAIŅU TESTS *IN VIVO*

1. METODE

Šī metode ir ESAO TG 475 metodes "Zīdītāju kaulu smadzeņu hromosomu izmaiņu tests" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Zīdītāju hromosomu izmaiņu testu *in vivo* izmanto tādu hromosomu struktūras izmaiņu noteikšanai, ko testa viela izraisa dzīvnieku, parasti grauzēju, kaulu smadzeņu šūnās (1) (2) (3) (4). Struktūras izmaiņas var būt divu veidu — hromosomu izmaiņas vai hromatīdu izmaiņas. Poliploīdijas palielināšanās var liecināt, ka ķīmiskā viela, iespējams, rada hromosomu skaita izmaiņas. Lielākā daļa ķīmisko mutagēnu izraisa hromatīdu izmaiņas, tomēr notiek arī hromosomu izmaiņas. Hromosomu mutācijas un ar tām saistītās pārmaiņas ir daudzu cilvēka ģenētisko slimību cēlonis, turklāt ir pierādīts, ka hromosomu mutācijas un ar tām saistītie procesi rada onkogēnu un tumorsupresoro gēnu izmaiņas, izraisot vēzi cilvēkiem un izmēģinājumu dzīvniekiem.

Šim testam parasti izmanto grauzējus. Šajā testā mērķaudi ir kaulu smadzenes, jo tās ir ļoti labi apasiņotas, turklāt šo audu šūnu cikls ir īss, un tās ir viegli izolējamas un apstrādājamas. Šai metodei neizmanto citu sugu dzīvniekus vai cita veida audus.

Šis hromosomu izmaiņu tests ir īpaši piemērots ar vielu mutagēnajām īpašībām saistītā kaitīguma noteikšanai, jo iespējams novērtēt *in vivo* metabolisma faktorus, farmakokinētiku un DNS reparācijas procesus, kas gan dažādām sugām attiecīgajos audos var būt atšķirīgi. Testu *in vivo* var izmantot arī *in vitro* konstatētās mutagēnās iedarbības sīkākai izpētei.

Gadījumos, kad noskaidrots, ka testa viela vai tās reaģētspējīgs metabolisma produkts mērķaudos nenonāk, šo testu neizmanto.

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Hromatīdu tipa izmaiņas: hromosomas struktūras bojājumi, kas izpaužas kā atsevišķu hromatīdu pārrāvumi, vai hromatīdu pārrāvumi un to rekombinācija.

Hromosomas tipa izmaiņas: hromosomas struktūras bojājumi, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums vai pārrāvums un rekombinācija vienā un tajā pašā vietā.

Endoreduplikācija: process, kurā pēc DNS replikācijas S perioda nenotiek šūnas kodola mitoze, bet sākas otrs S periods. Rezultātā izveidojas hromosomas ar 4, 8, 16,… hromatīdiem.

Pārrāvums: ahromatisks bojājums ar nelielu hromatīda(-u) nobīdi, kas ir mazāks par viena hromatīda platumu.

Hromosomu skaita izmaiņas: testam izmantojamajām šūnām raksturīgā parastā hromosomu skaita izmaiņas.

Poliploīdija: haploīda hromosomu skaita (n) daudzkārtnis, izņemot hromosomu diploīdu skaitu (t.i., 3n, 4n utt).

Struktūras izmaiņas: hromosomu struktūras izmaiņas, kas redzamas mikroskopā šūnu dalīšanās metafāzē, ko novēro kā trūkstošus posmus, fragmentus, iekšējas vai savstarpējas rekombinācijas.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Dzīvniekus pakļauj testa vielas iedarbībai, izmantojot piemērotu tās uzņemšanas veidu, un tad nogalina noteiktā laikā pēc apstrādes. Pirms nogalināšanas dzīvniekiem ievada metafāzi apturošu vielu (piemēram, kolhicīnu vai *Colcemid*®). Tad no kaulu smadzeņu šūnām pagatavo hromosomu preparātus, ko iekrāso, un metafāzes šūnām nosaka hromosomu izmaiņas.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošana**

1.4.1.1. *Dzīvnieku sugu izvēle*

Parasti izmanto žurkas, peles un Ķīnas kāmjus, tomēr var izmantot jebkuras piemērotas sugas zīdītājus. Parasti izmanto jaunus, veselīgus, pieaugušus laboratorijas dzīvniekus. Izmēģinājuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām, un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

1.4.1.2. *Turēšanas un barošanas nosacījumi*

Piemēro vispārējos nosacījumus, kas minēti Vispārīgā ievada B daļā, bet mitrumam vajadzētu būt 50-60 %.

1.4.1.3. *Dzīvnieku sagatavošana*

Veselīgus, jaunus, pieaugušus dzīvniekus pēc gadījuma izvēles principa sadala kontroles un apstrādes grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Katram dzīvniekam atsevišķi piešķir identifikāciju. Dzīvniekus laboratorijas apstākļiem aklimatizē vismaz piecas dienas.

1.4.1.4. *Devu sagatavošana*

Pirms došanas dzīvniekiem, cietas testa vielas vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var dozēt tieši vai pirms dozēšanas atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, pārbaudēm izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

1.4.2. **Testa apstākļi**

1.4.2.1. *Šķīdinātājs/nesējs*

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas iedarbības, un tas nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu. Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, ieteicams vispirms izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus.

1.4.2.2. *Kontroles*

Visos testos katram dzīvnieku dzimumam līdztekus iekļauj pozitīvu un negatīvu (šķīdinātāja/nesēja) kontroli. Izņemot apstrādi ar testa vielu, ar kontroles grupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

Pozitīvā kontrolē iegūst hromosomu struktūras izmaiņas *in vivo* pie ekspozīcijas robežvērtībām, kas dod nosakāmu palielinājumu virs fona līmeņa. Pozitīvās kontroles vielu koncentrācijas izvēlas tā, lai to iedarbība būtu skaidri redzama, tomēr kodēto priekšmetstikliņu identitāti to nolasītājs nevarētu konstatēt

uzreiz.Pieļaujams, ka pozitīvai kontrolei tiek izmantots cits iedarbības veids nekā testa vielai, un paraugu ņem tikai vienreiz. Ja iespējams, kā pozitīvās kontroles vielas izmanto savienojumus, kas pieder pie atbilstošām vielu grupām.

Pie pozitīvās kontroles vielām pieder:

Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.
etilmetānsulfonāts	62–50–0	200–536–7
nitrozoetilurīnviela	759–73–9	212–072–2
mitomicīns C	50–07–7	200–008–6
ciklofosfamīds	50–18–0	200–015–4
ciklofosfamīda monohidrāts	6055–19–2	
trietilēnmelamīns	51–18–3	200–083–5

Ja nav pieņemamu vēsturisku kontroles datu par dzīvnieku savstarpējām atšķirībām un tādu šūnu parādīšanās biežumu, kurās ir hromosomu struktūras izmaiņas, katrā paraugu ņemšanas laikā iekļauj negatīvas kontroles dzīvniekus, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet ar ko citādi rīkojas tāpat kā ar apstrādes grupu dzīvniekiem. Ja negatīvai kontrolei paraugus ņem tikai vienreiz, piemērotākais laiks ir pirmā paraugu ņemšanas reize. Turklāt jāizmanto arī tukšie mēģinājumi, izņemot gadījumus, kad ir iepriekš iegūti vēsturiski vai publicēti kontroldati, kas skaidri parāda, ka izvēlētajam šķīdinātājam nav kaitīgas vai mutagēnas iedarbības.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Katrā apstrādes un kontroles grupā iekļauj vismaz piecus abu dzimumu dzīvniekus. Ja izmēģinājuma veikšanas laikā ir pieejami citos testos iegūti dati par tās pašas sugas dzīvniekiem, kam izmantots tas pats iedarbības veids, un šie dati liecina, ka toksiskā iedarbība uz abu dzimumu īpatņiem būtiski neatšķiras, testam var izmantot tikai viena dzimuma dzīvniekus. Gadījumos, kad ķīmiskās vielas iedarbība uz cilvēka organismu katram dzimumam var būt atšķirīga, piemēram, dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, testu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem.

1.5.2. **Apstrādes shēma**

Ieteicams izmēģināt vienreizēju apstrādi ar vielu. Testa vielas devu var dot arī dalīti, t.i., divreiz vienā un tajā pašā dienā ik pēc dažām stundām, kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jādod liels vielas tilpums. Citiem devu režīmiem jābūt zinātniski pamatotiem.

Pēc apstrādes paraugus ņem vienā dienā divos atsevišķos laikos. Grauzējiem pirmais paraugu ņemšanas termiņš ir pēc 1,5 normāliem šūnas cikliem (kas parasti ir 12 līdz 18 stundas pēc apstrādes). Tā kā testa vielas uzņemšanai un metabolismam, kā arī tās iedarbībai uz šūnas cikla kinētiku vajadzīgs laiks, kas var ietekmēt optimālo laiku hromosomu izmaiņu noteikšanai, ieteicams paraugus otrreiz ņemt 24 stundas pēc tam, kad paraugi ņemti pirmoreiz. Ja devu režīms pārsniedz vienas dienas ilgumu, paraugus ņem vienreiz pēc 1,5 šūnas cikliem pēc tam, kad veikta pēdējā apstrāde.

Pirms nogalināšanas dzīvniekiem intraperitoniāli injicē atbilstošu devu metafāzi apturošas vielas (piemēram, kolhicīnu vai *Colcemid*®). Pēc tam ar atbilstošiem intervāliem ņem dzīvnieku paraugus. Pelēm šis intervāls ir aptuveni 3-5 stundas; Ķīnas kāmjiem šis intervāls ir aptuveni 4-5 stundas. Savāc kaulu smadzeņu šūnas, un tām nosaka hromosomu izmaiņas.

1.5.3. **Devu lielums**

Ja atbilstošu datu trūkuma dēļ vispirms veic orientējošu izmēģinājumu, tas jāizdara tajā pašā laboratorijā, kurā veiks galveno izmēģinājumu, izmantojot tās pašas sugas un dzimuma dzīvniekus, un ievērojot to pašu apstrādes režīmu (5). Ja viela ir toksiska, pirmajā paraugu ņemšanas reizē izmanto trīs devas. Šo devu intervālā ietver maksimāli toksiskās devas, kā arī vielas maztoksiskās vai netoksiskās devas. Vēlākajā paraugu ņemšanas laikā jāizmanto tikai lielākā deva. Kā lielāko nosaka devu ar tādām pašām toksiskās iedarbības pazīmēm kā lielākajai devai, kam varētu būt letāla iedarbība pēc tāda paša devu režīma. Vielām ar specifisku bioloģisko aktivitāti maztoksiskās un netoksiskās devās (piemēram, hormoniem un mitogēniem) var būt citi devu noteikšanas kritēriji, ko katrā konkrētā gadījumā izvērtē atsevišķi. Kā lielāko var noteikt arī devu, kas liecina par toksisku iedarbību uz kaulu smadzenēm (piemēram, lielāku par tādu devu, kas izraisa mitotiskā indeksa samazināšanos par 50 %).

1.5.4. **Iedarbības robežu tests**

Ja testā ar vienu vielas devu, kas ir vismaz 2 000 mg/kg ķermeņa svara, vienā paņēmienā vai divos paņēmienos vienā dienā toksisku iedarbību nekonstatē un pēc datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām var pamatoti uzskatīt, ka viela nav genotoksiska, pilnīgus izmēģinājumus ar trim vielas devām var uzskatīt par nevajadzīgiem. Ilgstošākos izmēģinājumos — līdz 14 dienām — maksimālā dienas deva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara un 1 000 mg/kg ķermeņa svara izmēģinājumos, kas pārsniedz 14 dienas. Paredzamā iedarbība uz cilvēku var norādīt uz to, ka devu iedarbības robežu pārbaudē jālieto lielāka deva.

1.5.5. **Devu došana**

Testa vielu parasti dod, mākslīgi barojot pa kuņģa caurulīti, piemērotu inkubācijas kanulu vai intraperitonālas injekcijas veidā. Var izmantot arī citus iedarbības veidus, ja šādai rīcībai ir pietiekams pamatojums. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var dot vai injicēt, ir atkarīgs no izmēģinājumu dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Lielāka tilpuma lietošana par norādīto ir jāpamato. Izņemot kairinošas un kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, testos lietotā tilpuma mainības ietekmi samazina, koriģējot tilpumu tā, lai pie visām devām tas būtu vienāds.

1.5.6. **Hromosomu sagatavošana**

Pēc nogalināšanas nekavējoties izņem kaulu smadzenes, tās apstrādā hipotoniskā šķīdumā un fiksē. Tad šūnas uznes uz priekšmetstikliņiem un iekrāso.

1.5.7. **Analīze**

Lai noteiktu citotoksicitāti, jānosaka mitotiskais indekss vismaz 1 000 šūnām no katra apstrādātā dzīvnieka (ieskaitot pozitīvas kontroles), kā arī no katra tukšās, negatīvas kontroles dzīvnieka.

No katra dzīvnieka analizē vismaz 100 šūnu. Šo daudzumu var samazināt gadījumos, kad novēro lielu skaitu hromosomu izmaiņu. Visus priekšmetstikliņus, arī pozitīvas un negatīvas kontroles priekšmetstikliņus, pirms mikroskopiskās analīzes kodē. Tā kā priekšmetstikliņu sagatavošanas procedūrā bieži tiek bojātas metafāzes šūnas, kuras zaudē hromosomas, uzskaitāmajās šūnās jābūt centromēru skaitam, kas vienāds ar 2n ± 2.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulas veidā. Eksperimenta vienība ir viens dzīvnieks. Katram dzīvniekam novērtē uzskaitīto šūnu daudzumu, hromosomu izmaiņu skaitu uz vienu šūnu, un šūnu daļu ar hromosomu struktūras izmaiņām. Uzskaita dažāda veida hromosomu struktūras izmaiņas, norādot to skaitu un biežumu gan apstrādātajām, gan kontrolei izmantotajām dzīvnieku grupām. Pārrāvumus uzskaita un norāda atsevišķi, bet kopējā izmaiņu biežumā tos parasti neiekļauj. Ja nekas neliecina par vielas iedarbības atšķirībām atkarībā no dzīvnieku dzimuma, statistiskās analīzes veikšanai par abu dzimumu dzīvniekiem iegūtos datus var apvienot.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvu rezultātu nosaka pēc vairākiem kritērijiem, piemēram, ar devu saistīta to šūnu daļas palielināšanās, kurās ir hromosomu struktūras izmaiņas, vai izmainītu šūnu skaita palielināšanās, pārbaudot vienu devu ar vienu paraugu ņemšanas laiku. Vispirms rezultātus izvērtē bioloģiski. Kā palīglīdzekli testa rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes (6). Statistiskais nozīmīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju. Apšaubāmus rezultātus pārbauda, veicot testu atkārtoti, turklāt atkārtotiem testiem vēlams mainīt eksperimenta apstākļus.

Poliploīdijas palielināšanās var liecināt, ka testa viela, iespējams, rada hromosomu skaita izmaiņas. Tādu šūnu skaita palielināšanās, kurās ir endoreduplicētas hromosomas, var norādīt uz to, ka testa viela, iespējams, kavē šūnu cikla attīstību (7) (8).

Uzskata, ka testa vielas mutagēnās īpašības nav konstatētas, ja tās pārbaudes rezultāti neatbilst iepriekšminētajiem kritērijiem.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Pozitīvi rezultāti hromosomu izmaiņu testā *in vivo* liecina, ka testa viela izmēģinājumu dzīvnieku sugai izraisa hromosomu izmaiņas kaulu smadzenēs. Negatīvi rezultāti liecina, ka izmēģinājuma apstākļos testa viela izmēģinājumu dzīvnieku sugai nerada hromosomu izmaiņas kaulu smadzenēs.

Jāizvērtē varbūtība, ka testa viela vai tās metabolīti sasniedz centrālās asinsrites sistēmu un jo īpaši mērķaudus (piemēram, sistēmiska toksicitāte).

3. **ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA**

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai:

Šķīdinātājs/nesējs:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u.c.,

— dzīvnieku masa testa sākumā, katrā grupā norādot robežas, vidējo lielumu un standartnovirzi.

Testa apstākļi:

— pozitīvas un negatīvas (nesēja/šķīdinātāja) kontroles,

— devu intervāla noteikšanas testa rezultāti gadījumos, kad tas veikts,

— pēc lieluma mazatšķirīgu devu izvēles pamatojums,

— informācija par testa vielas sagatavošanu,

— informācija par testa vielas došanu,

— iedarbības veida izvēles pamatojums,

— metodes, ar kurām nosaka, ka testa viela nonākusi centrālajā asinsritē vai mērķaudos gadījumos, kad tas nepieciešams,

— testa vielas koncentrācijas (ppm) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā dienas devā (mg/kg ķermeņa masas) gadījumos, kad tas nepieciešams,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— metafāzes apturēšanai izmantojamās vielas identifikācija, tās koncentrācija un apstrādes ilgums,

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,

— izmaiņu uzskaites kritēriji,

— analizēto šūnu skaits no viena dzīvnieka,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti:

— toksicitātes pazīmes,

— mitotiskais indekss,

— izmaiņu veids un skaits, ko norāda katram dzīvniekam atsevišķi,

— kopējais izmaiņu skaits grupās, norādot vidējos lielumus un standartnovirzes,

— grupās kopējais šūnu skaits ar izmaiņām, norādot vidējos lielumus un standartnovirzes,

— ploīdijas izmaiņas, ja tās tiek novērotas,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— līdztekus veiktās negatīvās kontroles dati,

— līdz šim iegūtie negatīvas kontroles vēsturiskie dati, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes,

— līdztekus veiktās pozitīvās kontroles dati.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

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

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

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

(4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the in Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, Mutation Res., 312, pp. 305-312.

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

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

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

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

4. C PIELIKUMS

"**B.12. MUTAGENITĀTE — ZĪDĪTĀJU ERITROCĪTU MIKROKODOLU TESTS *IN VIVO***

1. **METODE**

Šī metode ir ESAO TG 474 metodes "Zīdītāju eritrocītu mikrokodolu tests" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Zīdītāju *in vivo* mikrokodolu testu izmanto, lai noteiktu testa vielas kaitīgumu eritroblastu hromosomām vai mitotiskajam aparātam, analizējot eritrocītus, kas iegūti no dzīvnieku, parasti grauzēju, kaulu smadzeņu un/vai perifēro asiņu šūnām.

Ar mikrokodolu testu nosaka vielas, kas izraisa citoģenētiskus bojājumus, kuru dēļ veidojas mikrokodoli, kuros aizturēti hromosomu fragmenti vai veselas hromosomas.

Kad kaulu smadzeņu eritroblasts attīstās par polihromatisku eritrocītu, galvenais kodols tiek izspiests; izveidojušies mikrokodoli var palikt ārpus citādi anukleotīdās citoplazmas. Šajās šūnās tiek veicināta mikrokodolu parādīšanās, jo tām nav galvenā kodola. Tādu polihromatisku eritrocītu skaita pieaugums apstrādātajos dzīvniekos, kas satur mikrokodolus, liecina par izraisītiem hromosomu bojājumiem.

Šim testam parasti izmanto grauzēju kaulu smadzenes, jo šajos audos veidojas polihromatiski eritrocīti. Nenobriedušus (polihromatiskus) mikrokodolu eritrocītus perifērajās asinīs var mērīt visām dzīvnieku sugām, kurām konstatēta liesas nespēja aizvākt mikrokodolu eritrocītus, vai kuras ir pietiekami jutīgas pret vielām, kas rada hromosomu struktūras vai skaita izmaiņas. Mikrokodolus var atšķirt pēc vairākiem kritērijiem. Pie tiem pieder kinetohoras vai centromēru DNS klātbūtne vai trūkums mikrokodolos. Svarīgākais rādītājs ir nenobriedušu (polihromatisku) mikrokodolu eritrocītu daudzums. Gadījumos, kad izmēģinājuma dzīvniekus ar testa vielu apstrādā vismaz četras nedēļas, kā rādītāju var izmantot arī tādu nobriedušu (normāli hromatisku) eritrocītu skaitu no eritrocītu kopējā skaita perifērajās asinīs, kas satur mikrokodolus.

Mikrokodolu *in vivo* tests grauzējiem ir īpaši piemērots, lai novērtētu mutagenitātes risku, jo tas ļauj novērtēt *in vivo* metabolisma faktorus, farmakokinētiku un DNS reparācijas procesus, lai gan ģenētiskie raksturlielumi dažādām sugām attiecīgajos audos var būt atšķirīgi. Testu *in vivo* var izmantot arī *in vitro* konstatētās mutagēnās iedarbības sīkākai izpētei.

Gadījumos, kad noskaidrots, ka testa viela vai tās reaģētspējīgs metabolisma produkts mērķaudos nenonāk, šo testu neizmanto.

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Centromērs (kinetohors): hromosomas reģions(-i), ar kuriem šūnas dalīšanās laikā saistās vārpstiņas šķiedras, nodrošinot secīgu meitashromosomu pārvietošanos uz meitasšūnu poliem.

Mikrokodoli: mazi kodoli, kas papildus šūnu galvenajiem kodoliem mitozes (mejozes) telofāzē atsevišķi izveidojas, salīpot hromosomu fragmentiem vai veselām hromosomām.

Normāli hromatisks eritrocīts: nobriedis eritrocīts, kam nav ribosomu un kuru var atšķirt no nenobriedušiem polihromatiskiem eritrocītiem ar ribosomu selektīvu krāsojumu.

Polihromatisks eritrocīts: nenobriedis eritrocīts attīstības vidējā posmā, kas vēl satur ribosomas, un kuru tāpēc ar ribosomu selektīvu iekrāsojumu var atšķirt no nobriedušiem normāli hromatiskiem eritrocītiem.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Piemērotā veidā izmēģinājuma dzīvniekus pakļauj testa vielas iedarbībai. Ja izmanto kaulu smadzenes, dzīvniekus pēc apstrādes noteiktos termiņos nogalina, izņem kaulu smadzenes, sagatavo un iekrāso to preparātus (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Ja izmanto perifērās asinis, pēc apstrādes noteiktos termiņos ņem asinis, no kurām sagatavo un iekrāso uztriepes (4) (8) (9) (10). Izmēģinājumos, kuros izmanto perifērās asinis, starplaikam starp pēdējo pakļaušanu iedarbībai un šūnu ņemšanu jābūt iespējami mazam. Preparātos nosaka mikrokodolu klātbūtni.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošana**

1.4.1.1. *Dzīvnieku sugu izvēle*

Izmantojot kaulu smadzenes, izmēģinājumiem parasti izvēlas žurkas, tomēr var izmantot jebkuras citas piemērotas sugas zīdītājus. Izmantojot perifērās asinis, ieteicams izmēģinājumiem ņemt peles. Var izmantot jebkuras citas piemērotas sugas zīdītājus ar nosacījumu, ka šīm sugām liesa neaizvāc mikrokodolu eritrocītus, vai sugas, kuras ir pietiekami jutīgas pret vielām, kas izraisa hromosomu struktūras vai skaita izmaiņas. Parasti izmanto jaunus, veselus, pieaugušus laboratorijas dzīvniekus. Izmēģinājuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām, un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

1.4.1.2. *Turēšanas un barošanas nosacījumi*

Piemēro vispārējos nosacījumus, kas minēti Vispārīgā ievada B daļā, bet mitrumam vajadzētu būt 50-60 %.

1.4.1.3. *Dzīvnieku sagatavošana*

Veselus, jaunus, pieaugušus dzīvniekus pēc gadījuma izvēles principa sadala kontroles un apstrādes grupās. Katram dzīvniekam atsevišķi piešķir identifikāciju. Dzīvniekus laboratorijas apstākļiem aklimatizē vismaz piecas dienas. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi.

1.4.1.4. *Devu sagatavošana*

Pirms došanas dzīvniekiem, cietas testa vielas vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var dozēt tieši vai pirms dozēšanas atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, pārbaudēm izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

1.4.2. **Testa apstākļi**

1.4.2.1. *Šķīdinātājs/nesējs*

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas iedarbības, un tas nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu. Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, ieteicams vispirms izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus.

1.4.2.2. *Kontroles*

Visos izmēģinājumos katram dzīvnieku dzimumam līdztekus iekļauj pozitīvu un negatīvu (šķīdinātāja/nesēja) kontroli. Izņemot apstrādi ar testa vielu, ar kontrolgrupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat, kā ar apstrādes grupu dzīvniekiem.

Pozitīvā kontrolē iegūst mikrokodolus *in vivo* pie ekspozīcijas robežvērtībām, kas dod nosakāmu palielinājumu virs fona līmeņa. Pozitīvās kontroles vielu koncentrācijas izvēlas tā, lai to iedarbība būtu skaidri redzama, tomēr kodēto priekšmetstikliņu identitāti to nolasītājs nevarētu konstatēt uzreiz. Pieļaujams, ka pozitīvai kontrolei tiek izmantots cits iedarbības veids nekā testa vielai, un paraugu ņem tikai vienreiz. Ja iespējams, kā pozitīvās kontroles vielas izmanto savienojumus, kas pieder pie atbilstošām ķīmisko vielu grupām. Pie pozitīvās kontroles vielām pieder:

Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.
etilmetānsulfonāts	62–50–0	200–536–7
N-etil-N-nitrozourīnviela	759–73–9	212–072–2
mitomicīns C	50–07–7	200–008–6
ciklofosfamīds ciklofosfamīda monohidrāts	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
trietilēnmelamīns	51–18–3	200–083–5

Ja nav pieņemamu vēsturisko datu par dzīvnieku savstarpējām atšķirībām un tādu šūnu parādīšanās biežumu, kurās ir mikrokodoli, katrā paraugu ņemšanas laikā iekļauj negatīvas kontroles dzīvniekus, uz kuriem iedarbojas tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet citādi ar kontrolgrupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādes grupu dzīvniekiem. Ja negatīvai kontrolei paraugus ņem tikai vienreiz, piemērotākais laiks ir pirmā paraugu ņemšanas reize. Turklāt jāizmanto arī tukšos mēģinājumus, izņemot gadījumus, kad ir iepriekš iegūti vēsturiski vai publicēti kontroldati, kas skaidri parāda, ka izvēlētajam šķīdinātājam/nesējam nav kaitīgas vai mutagēnas iedarbības.

Izmantojot perifērās asinis, kā negatīvo kontroli var izmantot neapstrādātus dzīvniekus gadījumos, kad perifērās asinis izmēģinājumiem ņem neilgu laiku (piemēram, pēc 1-3 apstrādēm ar testa vielu), un iegūtie rezultāti ir tādās pašās robežās, kā vēsturiskie dati.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Katrā apstrādes un kontroles grupās jāiekļauj vismaz pieci dzīvnieki no katra dzimuma (11). Ja izmēģinājuma veikšanas laikā ir pieejami citos izmēģinājumos iegūti dati par tās pašas sugas dzīvniekiem, kam izmantots tas pats iedarbības veids, un šie dati liecina, ka toksiskā iedarbība uz abu dzimumu indivīdiem būtiski neatšķiras, izmēģinājumam var izmantot tikai viena dzimuma dzīvniekus. Gadījumos, kad ķīmisko vielu iedarbība uz cilvēka organismu katram dzimumam var būt atšķirīga, piemēram, dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, izmēģinājumu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem.

1.5.2. **Apstrādes shēma**

Nav iespējams ieteikt kādu standarta apstrādes shēmu (piemēram, viena, divas vai vairākas devas ar 24 stundu intervālu). Var ņemt paraugus pēc paplašināta devu režīma, kamēr izmēģinājumā konstatē pozitīvu efektu, vai negatīvam izmēģinājumam — tikmēr, kamēr tiek konstatēts toksiskums vai tiek izmantota robeždeva, un dozēšanu turpina līdz paraugu ņemšanas laikam. Testa vielas devu var dot arī dalīti, t.i., divreiz vienā un tajā pašā dienā ik pēc dažām stundām, kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jādod liels vielas tilpums.

Testu var veikt divējādi:

a) ar testa vielu dzīvniekus apstrādā vienreiz. Kaulu smadzeņu paraugus ņem vismaz divreiz; pirmo reizi ne agrāk kā 24 stundas un ne vēlāk kā 48 stundas pēc apstrādes, ar piemērotiem starplaikiem starp paraugu ņemšanas reizēm. Paraugu ņemšana agrāk par 24 stundām pēc apstrādes ir jāpamato. Perifēro

asiņu paraugus ņem vismaz divreiz; pirmo reizi ne agrāk kā 36 stundas un ne vēlāk kā 48 stundas pēc apstrādes, ar piemērotiem starplaikiem starp paraugu ņemšanas reizēm, bet nepārsniedzot 72 stundu starplaiku. Ja pozitīva reakcija konstatēta vienā paraugu ņemšanas reizē, papildu paraugi nav jāņem;

b) gadījumos, kad veic divas vai vairākas apstrādes (piemēram, divas vai vairākas apstrādes ar 24 stundu starplaiku), paraugus ņem vienreiz 18 līdz 24 stundu laikā pēc pēdējās apstrādes gadījumos, kad ņem kaulu smadzeņu paraugus, un 36 līdz 48 stundu laikā pēc pēdējās apstrādes gadījumos, kad ņem perifēro asiņu paraugus (12).

Gadījumos, kad tas vajadzīgs, var noteikt papildu paraugu ņemšanas laikus.

1.5.3. **Devu lielums**

Ja atbilstošu datu trūkuma dēļ vispirms veic orientējošu izmēģinājumu, tas jāizdara tajā pašā laboratorijā, kurā veiks galveno izmēģinājumu, izmantojot tās pašas sugas, līnijas un dzimuma dzīvniekus, un ievērojot to pašu apstrādes režīmu (13). Ja viela ir toksiska, pirmajā paraugu ņemšanas reizē izmanto trīs devas. Šo devu intervālā ietver maksimāli toksiskās devas, kā arī vielas maztoksiskās vai netoksiskās devas. Vēlākajā paraugu ņemšanas laikā jāizmanto tikai lielākā deva. Kā lielāko nosaka devu, kurai ir tādas pašas toksiskās iedarbības pazīmes kā lielākajai devai, kam varētu būt letāla iedarbība pēc tāda paša devu režīma. Vielām ar specifisku bioloģisko aktivitāti maztoksiskās un netoksiskās devās (piemēram, hormoniem un mitogēniem) var būt citi devu noteikšanas kritēriji, ko katrā konkrētā gadījumā izvērtē atsevišķi. Kā lielāko var noteikt arī devu, kas liecina par toksisku iedarbību uz kaulu smadzenēm (piemēram, nenobriedušu eritrocītu skaita samazināšanās salīdzinājumā ar to kopējo skaitu kaulu smadzenēs vai perifērajās asinīs).

1.5.4. **Iedarbības robežu tests**

Ja testā ar vienu vielas devu, kas ir vismaz 2 000 mg/kg ķermeņa svara vienā paņēmienā vai divos paņēmienos vienā dienā, toksisku iedarbību nekonstatē, un pēc datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām var pamatoti uzskatīt, ka tā nav genotoksiska, pilnīgus izmēģinājumus ar trim vielas devām var uzskatīt par nevajadzīgiem. Ilgstošākos izmēģinājumos — līdz 14 dienām — maksimālā dienas deva ir 2 000 mg/kg ķermeņa svara, un 1 000 mg/kg ķermeņa svara apstrādei, kas pārsniedz 14 dienas. Paredzamā iedarbība uz cilvēku var norādīt uz to, ka devu iedarbības robežu pārbaudē jālieto lielāka deva.

1.5.5. **Devu došana**

Testa vielu parasti dod, mākslīgi barojot pa kuņģa caurulīti, piemērotu inkubācijas kanulu vai intraperitonālas injekcijas veidā. Var izmantot arī citus iedarbības veidus, ja šādai rīcībai ir pietiekams pamatojums. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var dot, mākslīgi barojot vai injicējot, ir atkarīgs no izmēģinājumu dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Lielāka tilpuma lietošana par norādīto ir jāpamato. Izņemot kairinošas un kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, izmēģinājumiem lietotā tilpuma mainības ietekmi samazina, koriģējot tilpumu tā, lai pie visām devām tas būtu vienāds.

1.5.6. **Kaulu smadzeņu un asiņu sagatavošana**

Kaulu smadzeņu šūnas parasti iegūst tūlīt pēc nogalināšanas no augšstilba kaula vai lielkaula. Visbiežāk no augšstilba kaula vai lielkaula iegūtās šūnas preparē un iekrāso ar tradicionālām metodēm. Perifērās asinis iegūst no astes vēnas vai cita piemērota asinsvada. Asins šūnas tūlīt supravitāli iekrāso (8) (9) (10) vai arī vispirms sagatavo uztriepes, ko iekrāso pēc tam. Lietojot DNS specifisku krāsvielu (piemēram, akridīnoranžo (14) vai *Hoechst* 33258 plus pironīnu-Y (15), iespējams izvairīties no daļas artefaktu, kas saistīti ar DNS nespecifisku krāsvielu izmantošanu. Šīs priekšrocības neizslēdz parasto krāsvielu (piemēram, *Giemsa*) lietošanu. Var izmantot arī papildu sistēmas (piemēram, celulozes kolonnas to šūnu atdalīšanai, kurām ir kodoli (16)) ar nosacījumu, ka tās laboratorijā pareizi izmantojamas mikrokodolu preparātu sagatavošanai.

1.5.7. **Analīze**

Nenobriedušo eritrocītu skaita attiecību pret eritrocītu kopējo skaitu (nenobriedušie + nobriedušie) nosaka, saskaitot vismaz 200 eritrocītus no kaulu smadzenēm un vismaz 1 000 eritrocītus no perifērajām asinīm (17). Visus priekšmetstikliņus, arī pozitīvas un negatīvas kontroles priekšmetstikliņus, pirms mikroskopiskās analīzes kodē. Sastopot nenobriedušus eritrocītus ar mikrokodoliem, no katra dzīvnieka saskaita vismaz 2 000 nenobriedušu eritrocītu. Var iegūt papildus informāciju , saskaitot nobriedušus eritrocītus ar

mikrokodoliem. Analizējot priekšmetstikliņus, nenobriedušo eritrocītu attiecība pret eritrocītu kopējo skaitu nedrīkst būt mazāka par 20 % no kontroles lieluma. Apstrādājot dzīvniekus pastāvīgi četras nedēļas vai ilgāk, uz katru dzīvnieku mikrokodolu sastopamības noteikšanai saskaita vismaz 2 000 nobriedušu eritrocītu. Ja automātiskās analīzes sistēmas (šūnu suspensiju attēlu analīze un plūsmas citometriskā analīze) ir pienācīgi kalibrētas un verificētas, tās ir pieņemama alternatīva manuālajām novērtēšanas metodēm.

2. DATI

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulas veidā. Eksperimenta vienība ir viens dzīvnieks. Katram analizējamajam dzīvniekam atsevišķi uzskaita nenobriedušos eritrocītus, nenobriedušos eritrocītus ar mikrokodoliem un nenobriedušo eritrocītu kopskaitu no visiem eritrocītiem. Ja dzīvniekus pastāvīgi apstrādā četras nedēļas vai ilgāk, jānorāda arī dati par nobriedušajiem eritrocītiem, ja tie tiek iegūti. Par katru dzīvnieku norāda nenobriedušo eritrocītu skaita attiecību pret eritrocītu kopskaitu, un, ja tiek uzskatīts par vajadzīgu, arī to eritrocītu daļu, kuriem ir mikrokodoli. Ja nekas neliecina par vielas iedarbības atšķirībām atkarībā no dzīvnieku dzimuma, statistiskās analīzes veikšanai var apvienot datus, kas iegūti par abu dzimumu dzīvniekiem.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvu rezultātu nosaka pēc vairākiem kritērijiem, piemēram, ar devu saistīta to šūnu skaita palielināšanās, kurām ir mikrokodoli, vai šādu šūnu skaita palielināšanās, pārbaudot vienu devu ar vienu paraugu ņemšanas laiku. Vispirms rezultātus izvērtē bioloģiski. Kā palīglīdzekli pārbaužu rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes (18) (19). Statistiskais nozīmīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kura nosaka pozitīvu atbildes reakciju. Apšaubāmus rezultātus pārbauda, veicot testu atkārtoti, turklāt vēlams mainīt eksperimenta apstākļus.

Uzskata, ka testa vielas mutagēnās īpašības nav konstatētas, ja tās testa rezultāti neatbilst iepriekšminētajiem kritērijiem.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Pozitīvi mikrokodolu testa rezultāti liecina, ka testa vielas ietekmē hromosomu bojājumu vai mitotiskā aparāta bojājumu rezultātā izmēģinājumiem izmantotās sugas dzīvnieku eritroblastos veidojas mikrokodoli. Negatīvi rezultāti liecina, ka izmēģinājuma apstākļos testa viela izmēģinājumu dzīvnieku sugai nenobriedušos eritrocītos neizsauc mikrokodolu veidošanos.

Jāizvērtē iespējamība, ka testa viela vai tās metabolīti sasniedz centrālās asinsrites sistēmu un jo īpaši mērķaudus (piemēram, sistēmiska toksicitāte).

3. ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai:

Šķīdinātājs/nesējs:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u.c.,

— dzīvnieku masa izmēģinājuma sākumā, katrā grupā norādot robežas, vidējo lielumu un standartnovirzi.

Testa apstākļi:

— pozitīvas un negatīvas (nesēja/šķīdinātāja) kontroles dati,

— devu intervāla noteikšanas izmēģinājuma rezultāti gadījumos, kad tas veikts,

— devu izvēles pamatojums,

— informācija par testa vielas sagatavošanu,

— informācija par testa vielas došanu,

— iedarbības veida izvēles pamatojums,

— metodes, ar kurām nosaka, ka testa viela nonākusi centrālajā asinsritē vai mērķaudos gadījumos, kad tas nepieciešams,

— testa vielas koncentrācijas (ppm) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā dienas devā (mg/kg ķermeņa masas) gadījumos, kad tas nepieciešams,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— kritēriji, pēc kuriem uzskaita nenobriedušus eritrocītus ar mikrokodoliem,

— analizēto šūnu skaits no viena dzīvnieka,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti:

— toksicitātes pazīmes,

— nenobriedušu eritrocītu skaits no eritrocītu kopējā skaita,

— nenobriedušu eritrocītu skaits ar mikrokodoliem, norāda katram dzīvniekam atsevišķi,

— nenobriedušu eritrocītu ar mikrokodoliem vidējais skaits ± standartnovirze katrā izmēģinājuma dzīvnieku grupā,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— līdztekus iegūtie un vēsturiskie negatīvie rezultāti,

— līdztekus veiktās pozitīvās kontroles dati.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and 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 Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part 1, revised, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

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

4. D PIELIKUMS

"B.13/14 MUTAGENITĀTE — BAKTĒRIJU REVERSĀS MUTĀCIJAS TESTS

1. METODE

Šī metode ir ESAO TG 471 metodes "Baktēriju reversās mutācijas tests" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Baktēriju reversās mutācijas testā, lai noteiktu konkrētas mutācijas, pie kurām pieder vienas vai vairāku DNS bāzu pāru aizstāšana, pievienošana vai izslēgšana, izmanto *Salmonella typhimurium* un *Escherichia coli* celmus, kam vajadzīgas aminoskābes (1) (2) (3). Šā baktēriju reversās mutācijas testa princips ir tāds, ka ar to nosaka mutācijas, kas izlabo testam izmantojamo celmu mutācijas un atjauno baktēriju funkcionālās spējas sintezēt neaizstājamās aminoskābes. Reversās baktērijas nosaka pēc to augšanas spējas bez aminoskābēm, kas vajadzīgas mātes kontrolcelmam.

Noteiktas mutācijas ir daudzu cilvēka ģenētisko slimību cēlonis, turklāt ir pierādīts, ka tās somatiskajās šūnās rada onkogēnu un tumorsupresoro gēnu izmaiņas, izraisot vēzi cilvēkiem un izmēģinājumu dzīvniekiem. Baktēriju reversās mutācijas tests ir ātrs, lēts un diezgan vienkāršs. Daudziem kontrolcelmiem ir vairākas īpatnības, kuru dēļ tie ir jutīgāki mutāciju noteikšanai, ieskaitot atbilstošus DNS posmus reversijas vietās, lielu molekulu caurlaidības palielināšanos šūnās un DNS reparācijas sistēmu izslēgšanu vai nejaušas DNS pasivitātes pastiprināšanās procesus. Kontrolcelmu specifiskās īpašības var sniegt noderīgu informāciju par mutāciju veidiem, ko izraisa genotoksiskas vielas. Ļoti plaša datu bāze ir uzkrāta par baktēriju reversās mutācijas testu rezultātiem daudzām un dažādām struktūrām, un ir labi izstrādātas metodikas ķīmisko vielu pārbaudēm ar dažādām fizikāli ķīmiskajām īpašībām, ieskaitot viegli gaistošus savienojumus.

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Reversās mutācijas testā ar *Salmonella typhimurium* vai *Escherichia coli* nosaka tāda celma mutāciju, kam vajadzīga aminoskābe (attiecīgi — histidīns vai triptofāns), par celmu, kam nav vajadzīga aminoskābe no ārēja avota.

Mutagēni, kas izraisa bāzu pāra aizvietošanu, ir vielas, kuras izraisa DNS bāzu izmaiņas. Reversijas testā šīs mutācijas var notikt sākotnējās mutācijas vietā vai bakteriālā genoma citā vietā.

Mutagēni, kas izraisa olbaltuma sintēzes nolasīšanas fāzes nobīdi, ir vielas, kuras izraisa DNS viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanu vai izslēgšanu, tādējādi izmainot RNS nolasīšanu.

1.3. SĀKOTNĒJI APSVĒRUMI

Baktēriju reversās mutācijas testā izmanto prokariotu šūnas, kas atšķiras no zīdītāju šūnām pēc tādiem faktoriem kā izmantošana, metabolisms, hromosomu struktūra un DNS reparācijas procesi. Testiem, ko izdara *in vitro*, metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēns avots. Šāda metaboliskas aktivācijas sistēma nevar pilnībā imitēt apstākļus zīdītāju organismā *in vivo*. Tāpēc tests nedod tiešu informāciju par mutagēnu un kancerogēnu iedarbību uz zīdītājiem.

Baktēriju reversās mutācijas testu parasti izmanto vielas sākotnējai genotoksiskas aktivitātes novērtēšanai, un jo īpaši noteiktu mutāciju izraisīšanas aktivitātes noteikšanai. Plaša datubāze liecina, ka daudzas šajā testā pozitīvas ķīmiskās vielas uzrāda mutagēnu aktivitāti arī citos testos. Tomēr ir gadījumi, kad šajā testā netiek konstatēts, ka vielai ir mutagēnas īpašības; šā trūkuma iemeslisaistāmi ar nosakāmā parametra īpašo

raksturu, kā arī metabolisma aktivācijas vai bioloģiskās pieejamības atšķirībām. Savukārt faktori, kas palielina baktēriju reversās mutācijas testa jutību, var veicināt vielu mutagēnās aktivitātes pārvērtēšanu.

Baktēriju reversās mutācijas tests var nebūt piemērots noteiktām ķīmisko vielu grupām piederīgu savienojumu novērtēšanai, piemēram, tādu savienojumu mutagēnās aktivitātes novērtēšanai, kuriem ir izteikti bakteri cīdas īpašības (piemēram, dažas antibiotiskās vielas), kā arī savienojumiem, par kuriem ir pamats uzskatīt (vai ir noskaidrots), ka tie ietekmē tikai zīdītāju šūnu replikācijas sistēmu (piemēram, daži topoizomerāzes inhibitori un nukleozīdu analogi). Šādos gadījumos piemērotāki ir mutācijas testi, kuriem izmanto zīdītāju šūnas.

Lai gan daudzi savienojumi, kam šis tests ir pozitīvs, ir zīdītājiem kancerogēni, tomēr šī korelācija nav absolūta. Tā atkarīga no ķīmisko vielu grupas, pie kuras pieder pārbaudāmais savienojums, un ir kancerogēni, ko šajā testā noteikt nevar, jo to iedarbībai ir cits mehānisms, kas nav saistīts ar genotoksicitāti un kura nav baktēriju šūnās.

1.4. TESTA METODES PRINCIPS

Baktēriju šūnu suspensijas pakļauj testa vielas iedarbībai gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Ar ietveršanas metodi platē šīs suspensijas sajauc ar augšējā slāņa agaru, ar ko nekavējoties pārklāj nelielu barotnes daudzumu. Ar preinkubācijas metodi apstrādēs maisījumu inkubē un pēc tam sajauc ar augšējā slāņa agaru, ar ko pārklāj nelielu barotnes daudzumu. Pēc divas vai trīs dienas ilgas inkubācijas, saskaņā ar abām metodēm revertantās kolonijas skaita un salīdzina ar to revertanto koloniju skaitu, kas spontāni izveidojušās uz šķīdinātāja kontrolplatēm.

Aprakstītas vairākas baktēriju reversās mutācijas testa procedūras. Pie plašāk izmantotajām pieder ietveršanas metode platē (1) (2) (3) (4), preinkubācijas metode (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuācijas metode (9) (10), un suspensijas metode (11). Aprakstītas metodes modifikācijas gāzveida vai gaistošu vielu testēšanai (12).

Metodē aprakstītās procedūras pirmkārt attiecas uz platē ietveršanas un preinkubācijas metodēm. Tās abas ir piemērotas izmēģinājumiem gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās. Daļu vielu var labāk noteikt ar preinkubācijas metodi. Šie savienojumi pieder pie tādām ķīmisko vielu grupām kā alifātiskie nitrozoamīni ar īsu ķēdi, divvērtīgie metāli, aldehīdi, azokrāsvielas un diazosavienojumi, pirolizidīna alkaloīdi, alilsavienojumi un nitrosavienojumi (3). Atzīts arī, ka dažas mutagēnu klases ne vienmēr var atklāt, izmantojot standarta procedūras, piemēram, ietveršanas metodi platē vai preinkubācijas metodi. Tās būtu uzskatāmas par "pašiem gadījumiem", un to atklāšanai noteikti jāizmanto citas alternatīvas procedūras. Var izdalīt šādus "īpašus gadījumus" (kopā ar procedūrām, ko var izmantot to atklāšanai): azokrāsvielas un diazosavienojumi (3) (5) (6) (13), gāzveida un gaistošas vielas (12) (14) (15) (16) un glikozīdi (17) (18). Atkāpes no standarta procedūras zinātniski jāpamato.

1.5. TESTA METODES APRAKSTS

1.5.1. **Sagatavošana**

1.5.1.1. *Baktērijas*

Svaigas baktēriju kultūras izaudzē līdz eksponenciālās fāzes beigām vai stacionārās fāzes sākumam (aptuveni 10^9 šūnas mililitrā). Neizmanto kultūras, kas ir stacionārās fāzes beigās. Būtiski, lai izmēģinājumiem izmantojamajām kultūrām būtu augsts dzīvotspējīgo baktēriju titrs. Titru var novērtēt pēc vēsturiskajiem kontroles datiem par augšanas līknēm vai katrā analīzē nosakot dzīvotspējīgo šūnu skaitu ar pārklāšanas eksperimentu.

Ieteicamā inkubēšanas temperatūra ir 37 °C.

Izmanto vismaz piecus baktērijas celmus. No tiem četriem jābūt *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537; TA97a vai TA97; TA98; un TA100), jo pierādīts, ka ar tiem iegūst drošus un dažādās laboratorijās atkārtojamus rezultātus. Šiem četriem *S. typhimurium* celmiem primārās reversijas vietā ir GC bāzu pāri, un noskaidrots, ka ar tiem nevar atklāt dažus oksidējošus mutagēnus, sašūtus aģentus un hidrazīnus. Šīs vielas var detektēt ar *E. coli* WP2 celmiem, vai *S. typhimurium* TA 102 (19), kuriem primārās reversijas vietā ir AT bāzu pāris. Tāpēc ieteicamā izmantojamo celmu kombinācija ir:

— *S. typhimurium* TA1535, un

— *S. typhimurium* TA1537 vai TA97, vai TA97a, un

— *S. typhimurium* TA98, un

— *S. typhimurium* TA100, un

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

Oksidējošu mutagēnu atklāšanai var būt vēlams izmantot TA102 vai pievienot kādu DNS reparācijas *E. coli* celmu (piemēram, *E. coli* WP2 vai *E. coli* WP2 (pKM101)).

Rezerves kultūru pagatavošanai, marķeru verificēšanai un glabāšanai izmanto labi izstrādātas procedūras. Aminoskābju nepieciešamību augšanai jāparāda katrai saldētajai rezerves kultūrai (triptofāna vajadzību *S. typhimurium* celmiem, bet *E coli* celmiem triptofāna vajadzību. Līdzīgi pārbauda arī citas fenotipa īpašības, proti: gadījumos, kad tas ir vajadzīgs, R-faktora plazmīdu klātbūtni vai trūkumu (t.i., rezistenci pret ampicilīnu TA98, TA100 un TA97a vai TA97, WP2 uvrA un WP2 uvrA (pKM101) celmiem, bet rezistenci pret ampicilīnu un tetraciklīnu TA102 celmam); raksturīgās mutācijas (t.i., rfa mutāciju *S. typhimurium* pēc jutības uz kristālvioleto un uvrA mutāciju *E. coli* vai uvrB mutāciju *S. typhimurium* pēc jutības uz ultravioleto gaismu) (2) (3). Celmiem jādod arī revertantās kolonijas ar parādīšanās biežumu, kas atbilst laboratorijas vēsturiskajiem kontroles datiem, un vēlams, lai tas būtu literatūrā minētajās robežās.

1.5.1.2. *Barotne*

Izmanto piemērotu minimālo agaru (kas satur, piemēram, Fogeļa–Bonera (*Vogel-Bonner)* minimālo barotni E un glikozi), un augšējā slāņa agaru, kas satur histidīnu un biotīnu vai triptofānu dažiem šūnu dalīšanās cikliem vajadzīgajā daudzumā (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolisma aktivācija*

Baktērijas pakļauj testa vielas iedarbībai gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Plašāk izmantojamā aktivācijas sistēma ir ar kofaktoru papildināta pēcmitohondriskā frakcija (S9), ko pagatavo no grauzēju aknām, kas apstrādātas ar enzīmstimulējošām vielām, piemēram, *Aroclor* 1254 (1) (2), vai fenobarbitona un β-naftoflavona maisījumu (18) (20) (21). Pēcmitahondrālo frakciju parasti izmanto S9 maisījumā koncentrācijā no 5 līdz 30 tilp. %. Metabolisma aktivācijas sistēmas izvēle var būt atkarīga no ķimikāliju grupas, pie kuras pieder testa viela. Dažos gadījumos pēcmitohondriskā frakcija var būt jālieto vairākās koncentrācijās. Azokrāsvielu un diazosavienojumu pārbaudēm var būt piemērotāka metabolisma aktivācijas sistēma ar reducējošām īpašībām (6) (13).

1.5.1.4. *Testa viela/preparāts*

Pirms baktēriju apstrādes ar cietām testa vielām, tās vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var tieši pievienot testa sistēmā un/vai pirms šūnu apstrādes atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

Šķīdinātājs vai nesējs nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu, un tas nedrīkst nelabvēlīgi ietekmēt baktēriju dzīvotspēju un S9 aktivitāti (22). Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, ieteicams vispirms izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus. Pārbaudot ūdens vidē nestabilas vielas, izmanto bezūdens organiskos šķīdinātājus.

1.5.2. **Testa apstākļi**

1.5.2.1. *Testam izmantojamie celmi* (skat.1.5.1.1.)

1.5.2.2. *Pārbaudāmās koncentrācijas*

Viens no kritērijiem, kas jāņem vērā, nosakot lielāko izmantojamās testa vielas daudzumu, ir tās citotoksicitāte un šķīdība galīgajā apstrādes maisījumā.

Var būt lietderīgi iepriekšējā eksperimentā noteikt vielas toksicitāti un šķīdību. Citotoksicitāti var noteikt pēc revertanto koloniju skaita samazināšanās, fona pazušanas vai samazināšanās, vai pēc apstrādāto kultūru izdzīvošanas pakāpes. Vielas citotoksicitāte var mainīties metabolisma aktivācijas sistēmu klātbūtnē. To, ka viela ir nešķīstoša, novērtē pēc tās izgulsnēšanās, kas redzama ar neapbruņotu aci, galīgajā maisījumā testa faktiskajos apstākļos.

Ieteicamā maksimālā testa koncentrācija vielām, kas nav citotoksiskas, ir 5 mg uz plati vai 5 µl uz plati. Vielām, kas nav citotoksiskas un nav šķīstošas - 5 mg uz plati vai 5 µl uz plati, vienā vai vairākās pārbaudāmajās koncentrācijās jābūt nešķīstošām galīgajā apstrādes maisījumā. Testa vielas, kas ir citotoksiskas jau zem 5 mg uz plati vai 5 µl uz plati, pārbauda koncentrācijās, kas ir mazākas par citotoksisko koncentrāciju. Neizšķīdušas vielas klātbūtne nedrīkst traucēt skaitīšanu.

Sākotnējā izmēģinājumā vielu pārbauda vismaz piecās analizējamās koncentrācijās ar apmēram puslogaritmiskiem (t.i., maksimāli 10 reizes) intervāliem starp testa punktiem. Var izmantot mazākus koncentrāciju intervālus gadījumos, kad pēta koncentrāciju ietekmi. Var veikt izmēģinājumus ar koncentrācijām, kas pārsniedz 5 mg vai 5 µl uz plati gadījumos, kad testa viela ievērojamā daudzumā satur potenciāli mutagēnus piemaisījumus.

1.5.2.3. **Negatīvas un pozitīvas kontroles**

Katrā eksperimentā gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās vienlaicīgi iekļauj celmam piemērotas pozitīvas un negatīvas (šķīdinātāja vai nesēja) kontroles. Pozitīvai kontrolei izvēlas koncentrācijas, kas ir efektīvas visos izmēģinājumos.

Izmēģinājumos, kuros izmanto metabolisma aktivācijas sistēmas, standartvielu(-as) pozitīvai kontrolei jāizvēlas atbilstīgi lietoto baktēriju celma tipam.

Izmēģinājumos ar metabolisma aktivāciju pozitīvai kontrolei ir piemērotas šādas vielas:

Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.
9,10 dimetilantracēns	781–43–1	212–308–4
7,12 dimetilbenzantracēns	57–97–6	200–359–5
benzopirēns	50–32–8	200–028–5
2-aminoantracēns	613–13–8	210–330–9
ciklofosfamīds	50–18–0	200–015–4
ciklofosfamīda monohidrāts	6055–19–2	

Izmēģinājumiem ar reducējošās metabolisma aktivācijas metodi pozitīvai kontrolei ir piemērota šāda viela:

Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.
Kongo sarkanais	573–58–0	209–358–4

Kā vienīgo S9 maisījuma iedarbības indikatoru nevar izmantot 2-aminoantracēnu. Gadījumos, kad izmanto 2-aminoantracēnu, katrs S9 paraugs jāraksturo arī ar mutagēnu, kam vajadzīga metabolisma aktivācija ar mikrosomu fermentiem, piemēram, ar benzopirēnu vai dimetilbenzantracēnu.

Izmēģinājumos bez eksogēnas metabolisma aktivācijas sistēmas celmam specifiskai pozitīvai kontrolei ir piemērotas šādas vielas:

Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.	Celms
nātrija azīds	26628–22–8	247–852–1	TA 1535 un TA 100
2-nitrofluorēns	607–57–8	210–138–5	TA 98
9-aminoakridīns	90–45–9	201–995–6	TA 1537, TA 97 un TA 97a
ICR 191	17070–45–0	241–129–4	TA 1537, TA 97 un TA 97a
kumola hidroperoksīds	80–15–9	201–254–7	TA 102
mitomicīns C	50–07–7	200–008–6	WP2 uvrA un TA 102
N-etil-N-nitro-N-nitrozoguanidīns	70–25–7	200–730–1	WP2, WP2uvrA un WP2uvrA(pKM101)
4-nitrohinolīn-1-oksīds	56–57–5	200–281–1	WP2, WP2uvrA un WP2uvrA(pKM101)
furilfuramīds (AF2)	3688–53–7		plazmīdus saturoši celmi

Pozitīvai kontrolei var izmantot arī citas piemērotas standartvielas. Ja iespējams, kā pozitīvās kontroles vielas jāizmanto ķīmiskas vielas, kas pieder pie atbilstošām vielu grupām.

Jāiekļauj negatīvas kontroles, kurās ietilpst tikai šķīdinātājs vai nesējs un kurās nav testa vielu; ar tām rīkojas tieši tāpat, kā ar apstrādes grupām. Turklāt jāizmanto arī tukšie mēģinājumi, izņemot gadījumus, kad ir iepriekš iegūti vēsturiski kontroldati, kas skaidri parāda, ka izvēlētajam šķīdinātājam nav kaitīgas mutagēnas iedarbības.

1.5.3. **Procedūra**

Pēc iekļaušanas platē metodes (1) (2) (3) (4) bez metabolisma aktivācijas parasti ņem 0,05 ml vai 0,1 ml testa vielas šķīduma, 0,1 ml svaigas baktēriju kultūras (kurā ir apmēram 10^8 dzīvotspējīgas šūnas) un 0,5 ml sterila buferšķīduma, ko sajauc ar 2,0 ml augšējā slāņa agara. Izmēģinājumiem ar metabolisma aktivāciju parasti ņem 0,5 ml metabolisma aktivācijas maisījuma, kurā ir vajadzīgais daudzums pēcmitohondriskās frakcijas (metabolisma aktivācijas maisījumā koncentrācijā no 5 līdz 30 tilp. %), ko kopā ar baktērijām un testa vielu vai tās šķīdumu sajauc ar augšējā slāņa agaru (2,0 ml). Mēģeņu saturu sajauc un izlej mazās agara platēs. Pirms inkubācijas, augšējā slāņa agaram ļauj sacietēt.

Ar preinkubācijas metodes (2) (3) (5) (6) testa vielu vai tās šķīdumu parasti vispirms vismaz 20 minūtes inkubē 30-37 °C temperatūrā kopā ar testam izmantojamo celmu (kas satur apmēram 10^8 dzīvotspējīgas šūnas) un sterilu buferšķīdumu vai metabolisma aktivācijas sistēmu (0,5 ml), ko pēc tam sajauc ar augšējā slāņa agaru un izlej mazās agara platēs. Parasti ar 2,0 ml augšējā slāņa agara sajauc ar 0,05 vai 0,1ml testa vielas vai testa šķīduma, 0,1 ml baktēriju un 0,5 ml S9 maisījuma vai sterila buferšķīduma. Preinkubācijas laikā mēģenēm jāveic aerācija, lietojot kratītāju.

Pareizai variāciju novērtēšanai visas devas pārbauda trijos atkārtojumos. Izmēģinājumu var veikt divos atkārtojumos gadījumos, kad tam ir zinātnisks pamatojums. Kādas plates zaudējuma dēļ izmēģinājums nav uzskatāms par nederīgu.

Gāzveida un gaistošu vielu pārbaudēm izmanto atbilstošas metodes, piemēram, kultivēšanu hermētiski noslēgtos traukos (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubēšana**

Visas viena izmēģinājuma plates inkubē 48-72 stundas 37 °C temperatūrā. Pēc inkubēšanas nosaka revertanto koloniju skaitu uz katras plates.

2. DATI

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Rezultātus izsaka ar revertanto koloniju skaitu uz plati. Norāda arī revertanto koloniju skaitu gan uz negatīvās kontroles (uz šķīdinātāja kontroles un, ja izmantota, arī tukšā mēģinājuma), gan arī uz pozitīvās kontroles platēm. Testa vielai, pozitīvajai un negatīvajai (neapstrādātai un/vai šķīdinātāju) kontrolei norāda revertanto koloniju skaitu uz platēm, to vidējo skaitu un standartnovirzes.

Nav noteiktu prasību attiecībā uz pozitīvas reakcijas verificēšanu. Apšaubāmus rezultātus pārbauda, veicot atkārtoti pārbaudi, turklāt vēlams mainīt eksperimenta apstākļus. Negatīvi rezultāti katrā konkrētā gadījumā ir jāapstiprina. Gadījumos, kad negatīvu rezultātu apstiprināšanu uzskata par nevajadzīgu, tas ir jāpamato. Izmaiņas eksperimenta apstākļu parametros novērtē un nosaka papildu eksperimentos. Eksperimenta parametri, kurus var mainīt, ir pārbaudāmo koncentrāciju atšķirības, apstrādes metode (ietveršana platē vai šķidruma preinkubācija) un metabolisma aktivācijas apstākļi.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvu rezultātu nosaka pēc vairākiem kritērijiem, piemēram, atkarībā no koncentrācijas — pēc revertanto koloniju skaita palielināšanās uz plati, vai pēc vismaz viena celma revertanto koloniju skaita reproducējamas palielināšanās ar metabolisma aktivācijas sistēmu vai bez tās (23). Vispirms rezultātus izvērtē bioloģiski. Kā palīglīdzekli testu rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes (24). Tomēr statistiskais nozīmīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju.

Uzskata, ka testa vielas mutagēnās īpašības nav konstatētas, ja tās testa rezultāti neatbilst iepriekšminētajiem kritērijiem.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Pozitīvi baktēriju reversās mutācijas testa rezultāti liecina, ka testa viela izraisa *Salmonella typhimurium* un/vai *Escherichia coli* noteiktas mutācijas ar bāzu aizvietošanu vai olbaltuma sintēzes nolasīšanas fāzes nobīdi genomā. Negatīvi rezultāti liecina, ka testa apstākļos testa viela neizraisa mutācijas pārbaudītajām sugām.

3. ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai:

Šķīdinātājs/nesējs:

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Celmi:

— izmantotie baktēriju celmi,

— šūnu skaits kultūrā,

— celmu raksturojums.

Testa apstākļi:

— testa vielas daudzums uz vienu plati (mg/platē vai µl/platē), pamatojot izvēlēto devu un vienas koncentrācijas pārbaudei ņemto plašu skaitu,

— izmantotā barotne,

— metabolisma aktivācijas sistēmas veids un sastāvs, norādot pieņemamības kritērijus,

— apstrādes procedūras.

Rezultāti:

— toksicitātes pazīmes,

— izgulsnēšanās pazīmes,

— koloniju skaits uz katras plates,

— vidējais revertanto koloniju skaits uz plati un standartnovirze,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— līdztekus iegūtie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes,

— līdzšinējie vēsturiskie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

(1) 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. E PIELIKUMS

"B.17 MUTAGENITĀTE — ZĪDĪTĀJU ŠŪNU GĒNU MUTĀCIJU TESTS *IN VITRO*

1. METODE

Šī metode ir ESAO TG 476 metodes "Zīdītāju šūnu gēnu mutāciju tests *in vitro*" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Zīdītāju šūnu gēnu mutāciju testu *in vitro* var izmantot ķīmisko vielu izraisīto gēnu mutāciju noteikšanai. Pie šim nolūkam piemērotām šūnu līnijām pieder L5178Y peļu limfomas šūnas, CHO, CHO-AS52 un V79 līniju Ķīnas kāmju šūnas, un TK6 cilvēku limfoblastoīdās šūnas (1). Šīm šūnu līnijām parasti nosaka tādus ģenētiskos raksturlielumus kā mutācija pie timidīnkināzes (TK) un hipoksantīna-guanīna fosforiboziltransferāzes (HPRT), kā arī ksantīna-guanīna fosforiboziltransferāzes (XPRT) transgēna. TK, HPRT un XPRT mutāciju testos nosaka dažādas ģenētiskās norises. Pēc TK un XPRT autosomu atrašanās vietas var noteikt tādas ģenētiskās pārmaiņas (piemēram, lielus izlaidumus), ko nevar noteikt HPRT gēna atrašanās vietā X hromosomās (2) (3) (4) (5) (6).

Zīdītāju šūnu gēnu mutāciju testam *in vitro* var izmantot izveidotas šūnu līnijas vai šūnu celmus. Testam izmatojamās šūnas izvēlas pēc to augšanas spējas kultūrā un spontāno mutāciju biežuma stabilitātes.

Testiem, ko izdara *in vitro*, metaboliskai aktivācijai parasti jāizmanto eksogēns avots. Šāda metaboliskas aktivācijas sistēma nevar pilnībā imitēt apstākļus zīdītāju organismā *in vivo*. Jāraugās, lai novērstu apstākļus, kuros iegūst rezultātus, kas neraksturo mutagenitāti. Pozitīvus rezultātus, kas neraksturo mutagenitāti, var iegūt no pH izmaiņām, osmozes vai vielu augstas citotoksicitātes dēļ (7).

Šo testu izmanto zīdītājiem potenciāli mutagēnu un kancerogēnu vielu skrīningam. Daudzi savienojumi, kam šis tests ir pozitīvs, ir zīdītājiem kancerogēni; tomēr pilnīga korelācija starp šo testu un kancerogenitāti nepastāv. Korelācija ir atkarīga no ķīmisko vielu grupas, pie kuras pieder pārbaudāmais savienojums, un ir arvien vairāk pierādījumu, ka ir kancerogēni, ko ar šo testu noteikt nevar, jo to iedarbībai ir cits mehānisms, kas ar genotoksiskumu nesaistīts vai kura nav baktēriju šūnās (6).

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Tieša mutācija: gēna mutācija no vecāku tipa mutanta formas, ko rada iekodētā proteīna enzīma funkcijas aktivācijas izmaņas vai zudums.

Bāzu pāra aizstājēji mutagēni: vielas, kas izraisa viena vai vairāku DNS bāzu pāru aizstāšanu.

Mutagēni, kas izraisa olbaltuma sintēzes nolasīšanas fāzes nobīdi: vielas, kas DNS molekulā izraisa viena vai vairāku bāzu pāru pievienošanu vai izdzēšanu.

Fenotipa izpausmes laiks: periods, kura laikā neizmainīti gēnu produkti tiek izspiesti no šūnām, kurās notikušas mutācijas.

Mutāciju biežums: mutanto šūnu skaits, ko novēro attiecībā pret dzīvotspējīgo šūnu skaitu.

Relatīvais kopējais pieaugums: šūnu skaita palielināšanās laikā salīdzinājumā ar šūnu kontroles populāciju, ko aprēķina, reizinot suspensijas pieauguma attiecību pret negatīvo kontroli ar klonēšanas efektivitātes attiecību pret negatīvo kontroli.

Relatīvais suspensijas pieaugums: šūnu skaita palielināšanās izpausmes perioda laikā attiecībā pret negatīvo kontroli.

Dzīvotspēja: apstrādāto šūnu klonēšanas efektivitāte laikā, kad pēc izpausmes laika perioda beigām tās novieto uz plates selektīvos apstākļos.

Izdzīvošana: pēc apstrādes perioda beigām uz plates novietotu apstrādātu šūnu klonēšanas efektivitāte; izdzīvošanu parasti izsaka attiecībā pret kontrolšūnu populācijas izdzīvošanu.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Šūnas ar timidīnkināzes (TK) deficītu mutācijas $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ dēļ, ir rezistentas pret pirimidīna analoga trifluortimidīna (TFT) citotoksisko iedarbību. Timidīnkināzes kompetentās šūnas ir jutīgas pret TFT, kas izraisa šūnu metabolisma inhibēšanu un aptur šūnu turpmāko dalīšanos. Tādējādi mutantās šūnas var vairoties TFT klātbūtnē, bet normālām šūnām, kas satur timidīnkināzi, tas nav iespējams. Līdzīgi šūnas, kurās trūkst HPRT vai XPRT, izvēlas pēc rezistences pret 6-tioguanīnu (TG) vai 8-azaguanīnu (AG). Gadījumos, kad bāzes analogu vai savienojumu, kas saistīts ar selektīvo vielu, pēta kādā no zīdītāju šūnu gēnu mutācijas testiem, rūpīgi jāizvērtē testa vielas īpašības. Piemēram, jāizpēta testa vielas iespējamais selektīvais toksiskums gan mutantajām, gan nemutantajām šūnām. Tā jāapstiprina selekcijas sistēmas/vielas īpašības gadījumos, kad pārbauda ķīmiskās vielas, kuru struktūra ir līdzīga selektīvās vielas struktūrai (8).

Šūnas suspensijā vai vienslāņa kultūrā noteiktu laiku pakļauj testa vielas iedarbībai gan metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās, un pēc tam subkultivē, lai pirms mutanta selekcijas noteiktu citotoksicitāti un izpaustos fenotipiskās īpašības (9) (10) (11) (12) (13). Citotoksicitāti parasti nosaka, novērtējot kultūru relatīvo klonēšanas efektivitāti (izdzīvošanu), vai relatīvo kopējo pieaugumu pēc apstrādes perioda. Apstrādātās kultūras uztur augšanas vidē pietiekami ilgu laiku, kas ir raksturīgs katrai izvēlētajai gēna atrašanās vietai hromosomā un šūnas tipam, un gandrīz optimāli ļauj izpausties izraisīto mutāciju fenotipiskajām īpašībām. Mutāciju biežumu nosaka, izsējot noteiktu skaitu šūnu barotnē, kas satur selektīvo vielu mutanto šūnu noteikšanai, un barotnē bez selektīvās vielas, kurā nosaka klonēšanas efektivitāti (dzīvotspēju). Pēc atbilstoša inkubēšanas perioda saskaita kolonijas. Mutāciju biežumu aprēķina pēc mutanto koloniju skaita selektīvajā vidē un koloniju skaita neselektīvajā vidē.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošana**

1.4.1.1. *Šnas*

Šim testam var izmantot dažādu tipu šūnas, ieskaitot L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 vai TK6 šūnu subklonus. Šūnu tipiem, ko izmanto šim testam, jābūt jutīgiem pret ķīmiskajiem mutagēniem, ar augstu klonēšanas efektivitāti un stabilu spontāno mutāciju biežumu. Šūnām jābūt ar pārbaudītu mikoplazmas piesārņojumu, un piesārņotas šūnas testam nav izmantojamas.

Testam jābūt iepriekš noteiktai jutībai un pakāpei. Izmanto šūnu skaitu, kultūras un testa vielas koncentrācijas, kas atbilst šiem noteiktajiem parametriem (14). Minimālo dzīvotspējīgo šūnu skaitu, kas izdzīvo pēc apstrādes un ko izmanto katrā testa posmā, nosaka pēc spontāno mutāciju biežuma. Vispārīgs norādījums ir izmantot šūnu skaitu, kas ir vismaz 10 reizes lielāks par spontāno mutāciju biežumam apgriezto skaitli. Tomēr ieteicams izmantot vismaz 10^6 šūnas. Lai testam noteiktu konsekventus veiktspējas rādītājus, vajadzīgi pietiekami vēsturiskie dati par šūnu sistēmu.

1.4.1.2. *Barotnes un kultivēšanas apstākļi*

Izmanto piemērotu kultivēšanas barotni, ievērojot attiecīgus inkubēšanas apstākļus (kultivēšanas trauki, temperatūra, CO_2 koncentrācija un mitrums). Barotni izvēlas atbilstoši testā izmantojamajām selektīvajām sistēmām un šūnu tipam. Īpaši svarīgi ir izvēlēties tādus kultivēšanas apstākļus, kuros tiek nodrošināta optimāla augšana izpausmes perioda laikā, un koloniju veidošanas spēja gan mutantajām, gan nemutantajām šūnām.

1.4.1.3. *Kultūru sagatavošana*

Šūnas pavairo no rezerves kultūrām, tās izsējot kultivēšanas barotnē un inkubējot 37 °C temperatūrā. Pirms izmantošanas testam, kultūras var būt jāattīra no tajās esošajām mutantajām šūnām.

1.4.1.4. *Metabolisma aktivācija*

Šūnas pakļauj testa vielas iedarbībai gan piemērotas metabolisma aktivācijas sistēmas klātbūtnē, gan bez tās. Plašāk izmantojamā aktivācijas sistēma ir ar kofaktoru papildināta pēcmitohondriskā frakcija (S9), ko pagatavo no grauzēju aknām, kas apstrādātas ar enzīmstimulējošām vielām, piemēram, *Aroclor* 1254 (15) (16) (17) (18) vai fenobarbitona un β-naftoflavona maisījumu (19) (20).

Pēcmitohondrisko frakciju parasti izmanto galīgā testa barotnē koncentrācijā no 1-10 tilp. %. Metabolisma aktivācijas sistēmas izvēle var būt atkarīga no savienojumu grupas, pie kuras pieder testa viela. Dažos gadījumos pēcmitohondriskā frakcija var būt jālieto vairākās koncentrācijās.

Endogēnai aktivācijai var izmantot dažādus paņēmienus, arī ar gēnu inženierijas metodēm iegūtas šūnu līnijas, kas izdala specifiskus aktivācijas enzīmus. Izmantojamo šūnu līniju izvēlei jābūt zinātniski pamatotai (piemēram, ar citohroma P450 izoenzīma nepieciešamību testa vielas metabolismam).

1.4.1.5. *Testa vielas sagatavošana*

Pirms šūnu apstrādes ar cietām testa vielām, tās vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var tieši pievienot testa sistēmā un/vai pirms šūnu apstrādes atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

1.4.2. **Testa apstākļi**

1.4.2.1. *Šķīdinātājs/nesējs*

Šķīdinātājs vai nesējs nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu, un tas nedrīkst nelabvēlīgi ietekmēt šūnu dzīvotspēju un S9 aktivitāti. Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, ieteicams vispirms izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus. Pārbaudot ūdens vidē nestabilas vielas, izmanto bezūdens organiskos šķīdinātājus. Ūdeni var atdalīt, pievienojot molekulāros sietus.

1.4.2.2. *Pārbaudāmās koncentrācijas*

Starp kritērijiem, kas jāņem vērā, nosakot testa vielas lielāko koncentrāciju, ir tās citotoksikums, šķīdība testa sistēmā, kā arī ietekme uz pH izmaiņām vai osmoze.

Citotoksicitāti jānosaka galvenajā eksperimentā ar metabolisma aktivāciju un bez tās, izmantojot piemērotus šūnu integritātes un augšanas rādītājus, piemēram, klonēšanas relatīvo efektivitāti (izdzīvošanu) vai relatīvo kopējo pieaugumu. Var būt lietderīgi iepriekš orientējošā eksperimentā noteikt vielas citotoksicitāti un šķīdību.

Būtu jāizmanto vismaz trīs analizējamas koncentrācijas. Ja viela ir citotoksiska, koncentrāciju intervālā jāietver maksimāli toksiskās koncentrācijas, kā arī vielas maztoksiskās vai netoksiskās koncentrācijas. Parasti tas nozīmē, ka koncentrācijas nedrīkst atšķirties vairāk nekā 2 līdz 10 reizes. Ja maksimālo koncentrāciju nosaka pēc citotoksicitātes, tad tai jābūt aptuveni 10 — 20 % (bet ne mazāk par 10 %) no relatīvās izdzīvošanas (relatīvās klonēšanas efektivitātes) vai relatīvā kopējā pieauguma. Vielām ar relatīvi nelielu citotoksicitāti maksimālajai testa koncentrācijai vajadzētu būt 5 mg/ml, 5 µl/ml vai 1,01 M, no kurām izvēlas mazāko.

Relatīvi nešķīstošas vielas pārbauda zem vai virs tās šķīdības robežas kultūras apstākļos. Nešķīdību nosaka galīgajā apstrādes barotnē, kurā šūnas pakļauj testa vielas iedarbībai. Var būt lietderīgi novērtēt vielas šķīdību apstrādes sākumā un beigās, jo šķīdība var mainīties testa sistēmas ietekmē šūnu, S9, seruma un citu faktoru klātbūtnē. Neizšķīdušas vielas klātbūtni var noteikt vizuāli ar neapbruņotu aci. Neizšķīdušas vielas klātbūtne nedrīkst traucēt skaitīšanu.

1.4.2.3. *Kontroles*

Katrā eksperimentā gan ar metabolisma aktivāciju, gan bez tās vienlaicīgi iekļauj pozitīvas un negatīvas (šķīdinātāja vai nesēja) kontroles. Izmantojot metabolisma aktivāciju, pozitīvas kontroles vielas mutagēnai iedarbībai ir vajadzīga aktivācija.

Pie pozitīvās kontroles vielām pieder:

Metabolisma aktivācijas apstākļi	Gēna atrašanās vieta hromosomā	Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.
Bez eksogēnas metabolisma aktivācijas	HPRT	Etilmetānsulfonāts	62–50–0	200–536–7
		Nitrozoetilurīnviela	759–73–9	212–072–2
	TK (mazām un lielām kolonijām)	Metilmetānsulfonāts	66–27–3	200–625–0
	XPRT	Etilmetānsulfonāts	62–50–0	200–536–7
		Nitrozoetilurīnviela	759–73–9	212–072–2
Ar eksogēnu metabolisma aktivāciju	HPRT	3-Metilholantrēns	56–49–5	200–276–4
		N-Nitrozodimetilamīns	62–75–9	200–549–8
		7,12-Dimetilbenzantracēns	57–97–6	200–359–5
	TK (mazām un lielām kolonijām)	Ciklofosfamīds	50–18–0	200–015–4
		Ciklofosfamīda monohidrāts	6055–19–2	
		Benzopirēns	50–32–8	200–028–5
		3-Metilholantrēns	56–49–5	200–276–5
	XPRT	N-Nitrozodimetilamīns (augstiem S9 līmeņiem)	62–75–9	200–549–8
		Benzopirēns	50–32–8	200–028–5

Pozitīvai kontrolei var izmantot citas piemērotas standartvielas, piemēram, ja laboratorijā ir vēsturisko datu bāze par 5-brom-2′-dezoksiuridīnu (*CAS* Nr. 59–14–3, *Einecs* Nr. 200–415–9), var izmantot arī šo standartvielu. Ja iespējams, kā pozitīvās kontroles vielas izmanto savienojumus, kas pieder pie atbilstošām vielu grupām.

Iekļauj arī negatīvu kontroli, kad apstrādes barotnē ietilpst tikai šķīdinātājs vai nesējs, un ar to rīkojas tieši tāpat, kā ar apstrādes grupām. Turklāt jāizmanto arī tukšie mēģinājumi, izņemot gadījumus, kad ir iepriekš iegūti vēsturiskie dati, kas skaidri parāda, ka izvēlētajam šķīdinātājam nav kaitīgas vai mutagēnas iedarbības.

1.4.3. **Procedūra**

1.4.3.1. *Iedarbība ar testa vielu*

Ar metabolisku aktivāciju un bez tās uz augošām šūnu kultūrām iedarbojas ar testa vielu. Uz šūnām iedarbojas noteiktu laiku (parasti 3-6 stundas). Iedarbības laiku vai pagarināt līdz vienam vai vairākiem šūnu cikliem.

Pie katras pārbaudāmās koncentrācijas izmanto vienu vai divas apstrādātas kultūras. Izmantojot vienu kultūru, palielina pārbaudāmo koncentrāciju skaitu, tādējādi nodrošinot pietiekamu analizējamo kultūru skaitu (piemēram, vismaz astoņas analizējamas koncentrācijas). Izmanto dublikātu negatīvās (šķīdinātāja) kontrolkultūras.

Gāzveida un gaistošu vielu pārbaudēm jāizmanto atbilstošas metodes, piemēram, kultivēšanu hermētiski noslēgtos traukos (21) (22).

1.4.3.2. *Izdzīvošanas, dzīvotspējas un mutāciju biežuma noteikšana*

Pēc iedarbības perioda ar testa vielu, šūnas mazgā un kultivē, lai noteiktu izdzīvošanu un izpaustos mutanto šūnu fenotipa īpašības. Citotoksicitāti parasti nosaka, novērtējot kultūru relatīvo klonēšanas efektivitāti (izdzīvošanu) vai relatīvo kopējo pieaugumu pēc apstrādes perioda.

Katrai gēna atrašanās vietai hromosomā ir noteikts minimālais laiks, kurā iespējami optimāli izpaužas no jauna izraisīto mutantu fenotipa īpašības (HPRT un XPRT vajadzīgas vismaz 6-8 dienas, bet TK — vismaz divas dienas). Lai noteiktu mutantu skaitu un klonēšanas efektivitāti, šūnas audzē attiecīgās barotnēs, kam pievienotas selektīvās vielas, un bez tām. Dzīvotspējas noteikšanu (ko izmanto mutāciju biežuma aprēķināšanai) sāk fenotipa īpašību izpausmes perioda beigās, tās izsējot neselektīvā barotnē.

Ja L5178Y $TK^{+/-}$ testā pārbaudāmā viela ir pozitīva, vismaz vienai no testa kultūrām (ar lielāko pozitīvo koncentrāciju), kā arī negatīvā un pozitīvā kontrolē nosaka koloniju lielumu. Ja L5178Y $TK^{+/-}$ testā pārbaudāmā viela ir negatīva, koloniju lielumu nosaka negatīvā un pozitīvā kontrolē. Koloniju lielumu var noteikt arī izmēģinājumos, kuriem izmanto TK6$TK^{+/-}$ testu.

2. DATI

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Rezultātos ietilpst citotoksicitātes un dzīvotspējas noteikšana, koloniju skaits un mutāciju biežums apstrādātajās un kontroles kultūrās. Ja L5178Y $TK^{+/-}$ tests ir pozitīvs, pie vienas testa vielas koncentrācijas (lielākās pozitīvās koncentrācijas), kā arī negatīvajā un pozitīvajā kontrolē nosaka lielu un mazu koloniju skaitu. Sīki izpēta lielo un mazo koloniju mutantu molekulārās un citoģenētiskās īpašības (23) (24). $TK^{+/-}$ testā kolonijas uzskaita pēc tādiem kritērijiem kā normāla auguma (lielās) un lēni augošas (mazās) kolonijas (25). Mutantu šūnām ar lielākajiem ģenētiskajiem bojājumiem ir ilgāks skaita dubultošanās laiks, un tāpēc tās veido mazas kolonijas. Šie bojājumi parasti ir no vesela gēna zuduma līdz kariotipā redzamām hromosomu izmaiņām. Mazas kolonijas veidojošu mutantu šūnu rašanās saistāma ar vielām, kuras izraisa ievērojamas hromosomu izmaiņas (26). Mazāk bojātu mutantu šūnu augšanas ātrums ir līdzīgs mātesšūnu augšanas ātrumam, un tās veido lielas kolonijas.

Būtu jānorāda arī šūnu izdzīvošana (relatīvā klonēšanas efektivitāte) vai relatīvais kopējais pieaugums. Mutāciju biežumu izsaka ar mutantu šūnu skaita attiecību pret izdzīvojušo šūnu skaitu.

Norāda datus par atsevišķām kultūrām. Bez tam visus datus apkopo tabulas veidā.

Attiecībā uz pozitīvas reakcijas verificēšanu nav noteiktu prasību. Apšaubāmus rezultātus pārbauda, veicot atkārtotu testu, turklāt vēlams mainīt eksperimenta apstākļus. Negatīvi rezultāti katrā konkrētā gadījumā ir jāapstiprina. Gadījumos, kad negatīvu rezultātu apstiprināšanu uzskata par nevajadzīgu, tas ir jāpamato. Iegūstot apšaubāmus vai negatīvus rezultātus, izmēģinājuma parametru izmaiņas novērtē un nosaka kontroles eksperimentos. Izmēģinājuma parametri, kurus var mainīt, ir pārbaudāmo koncentrāciju atšķirības un metabolisma aktivācijas apstākļi.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvu rezultātu nosaka pēc vairākiem kritērijiem, tādiem kā ar koncentrācijas izmaiņām saistītā mutāciju biežuma vai reprodukcējamā biežuma palielināšanās. Vispirms rezultātus izvērtē bioloģiski. Kā palīglīdzekli pārbaužu rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes. Statistiskais nozīmīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju.

Gadījumos, kas testu rezultāti neatbilst minētajiem kritērijiem, uzskata, ka testa viela šajā sistēmā nav mutagēna.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no izmēģinājuma atkārtojumu skaita.

Zīdītāju šūnu gēnu mutāciju testā *in vitro* iegūti pozitīvi rezultāti liecina, ka testa viela izraisa izmantoto zīdītāju šūnu kultūru gēnu mutācijas. Lielāka nozīme ir reproducējamam mutāciju skaita pieaugumam, palielinoties testa vielas koncentrācijai. Negatīvi rezultāti liecina, ka izmēģinājuma apstākļos testa viela neizraisa izmantoto zīdītāju šūnu kultūru gēnu mutācijas.

3. ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai:

Šķīdinātājs/nesējs:

— šķīdinātāja/nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Šūnas:

— šūnu veids un izcelsme,

— šūnu kultūru skaits,

— pārneses reižu skaits, ja vajadzīgs,

— šūnu kultūru uzturēšanas metodes, ja vajadzīgs,

— mikoplazmas trūkums.

Testa apstākļi:

— vielas koncentrāciju un šūnu kultūru skaita izvēles pamatojums, piemēram, dati par citotoksiskajām īpašībām un šķīdības robežām, ja tie ir pieejami,

— barotnes sastāvs, CO_2 koncentrācija,

— testa vielas koncentrācija,

— pievienotā nesēja un testa vielas tilpums,

— inkubēšanas temperatūra,

— inkubēšanas ilgums,

— apstrādes ilgums ar testa vielu,

— šūnu blīvums apstrādes laikā,

— metabolisma aktivācijas sistēmas veids un sastāvs, norādot pieņemamības kritērijus,

— pozitīvas un negatīvas kontroles,

— fenotipa īpašību izpausmes periods (norādot izsēto šūnu skaitu un subkultūras, barošanas grafiku, ja ir),

— selektīvie aģenti,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs,

— dzīvotspējīgo šūnu un mutantu šūnu skaita noteikšanas metodes,

— uzskaitīto koloniju lielums un veids (pēc vajadzības norādot kritērijus, pēc kuriem nosaka lielas vai mazas kolonijas).

Rezultāti:

— toksicitātes pazīmes,

— izgulsnēšanās pazīmes,

— dati par pārbaudes barotnes pH un osmozi iedarbības laikā ar testa vielu, ja tie noteikti,

— koloniju lielums, ja tas noteikts vismaz negatīvajā un pozitīvajā kontrolē,

— laboratorijas iespējas noteikt mazas kolonijas veidojošas mutantu šūnas ar L5178Y $TK^{+/-}$ sistēmu gadījumā, ja tas ir vajadzīgs,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— līdztekus iegūtie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti,

— līdzšinējie vēsturiskie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes,

— mutāciju biežums.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. F PIELIKUMS

"**B.23 ZĪDĪTĀJU SPERMATOGONĀLO HROMOSOMU IZMAIŅU TESTS**

1. **METODE**

Šī metode ir ESAO TG 483 metodes "Zīdītāju spermatogonālo hromosomu izmaiņu tests" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Zīdītāju spermatogonālo hromosomu izmaiņu testā *in vivo* nosaka vielas, kas zīdītāju spermatogonālajās šūnās rada hromosomu struktūras izmaiņas (1) (2) (3) (4) (5). Struktūras izmaiņas var būt divu veidu — hromosomu izmaiņas vai hromatīdu izmaiņas. Lielākā daļa ķīmisko mutagēnu izraisa hromatīdu izmaiņas, tomēr notiek arī hromosomu izmaiņas. Šī metode nav paredzēta hromosomu skaita izmaiņu noteikšanai šūnās, un parasti to tādām vajadzībām neizmanto. Hromosomu mutācijas un ar tām saistītās ģenētiskās pārmaiņas ir cēlonis daudzām cilvēku ģenētiskajām slimībām.

Šajā testā nosaka hromosomu pārmaiņas spermatogonālajās dzimumšūnās, un tāpēc pēc tā rezultātiem var prognozēt pārmantojamu mutāciju izraisīšanu dzimumšūnās.

Šim testam parasti izmanto grauzējus. Šajā citiģenētiskajā testā *in vivo* nosaka hromosomu izmaiņas spermatogonālajās mitozēs. Šai metodei neizmanto citas mērķšūnas.

Lai noteiktu hromatīdu tipa izmaiņas spermatogonālajās šūnās, izpēta šūnu pirmo mitotisko dalīšanos, kura notiek pēc apstrādes ar testa vielu, pirms šie bojājumi netiek zaudēti turpmākajos šūnu dalīšanās ciklos. Papildus informāciju no apstrādātajām spermatogonālajām mātesšūnām var iegūt mejotisko hromosomu analīzē, nosakot hromosomu tipa izmaiņas diakinēzes metafāzē I, kad apstrādātās šūnas kļūst par spermatocītiem.

Šajā *in vivo* testā pēta, vai somatisko šūnu mutagēniem ir šāda veida iedarbība arī uz dzimumšūnām. Bez tam, spermatogonālajā testā novērtē mutagenitātes risku, ņemot vērā *in vivo* metabolisma faktorus, farmakokinētiku un DNS reparācijas procesus.

Sēkliniekos ir vairākas spermatogonālo šūnu paaudzes ar atšķirīgu jutību uz apstrādi ar ķīmisko vielu. Tāpēc atklātās izmaiņas raksturo tādu apstrādātu sermatogonālo šūnu populācijas kopēju atbildes reakciju, kurā pārsvarā ir diferencētas spermatogonālās šūnas. Atkarībā no to atrašanās vietas sēklinieka, fiziskās un fizioloģiskās Sertolli šūnu barjeras, kā arī asinsrites un sēklinieka barjeras dēļ uz dažādām spermatogonālo šūnu paaudzēm centrālā asinsrite var iedarboties vai arī neiedarboties.

Gadījumos, kad noskaidrots, ka testa viela vai tās reaģētspējīgs metabolisma produkts mērķaudos nenonāk, šo testu neizmanto.

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Hromatīdu tipa izmaiņas: hromosomas struktūras bojājumi, kas izpaužas kā atsevišķu hromatīdu pārrāvumi, vai hromatīdu pārrāvumi un to rekombinācija.

Hromosomu tipa izmaiņas: hromosomas struktūras bojājumi, kas izpaužas kā abu hromatīdu pārrāvums, vai pārrāvums un rekombinācija vienā un tajā pašā vietā.

Pārrāvums: ahromatisks bojājums ar nelielu hromatīdu nobīdi, kas ir mazāks par viena hromatīda platumu.

Hromosomu skaita izmaiņas: testam izmantojamajiem dzīvniekiem raksturīgā parastā hromosomu skaita izmaiņas.

Poliploīdija: haploīda hromosomu skaita (n) daudzkārtnis, izņemot hromosomu diploīdu skaitu (t.i., 3n, 4n utt.).

Struktūras izmaiņas: hromosomu struktūras izmaiņas, kas redzamas mikroskopā šūnu dalīšanās metafāzē, ko novēro kā trūkstošus posmus, fragmentus, iekšējas vai savstarpējas rekombinācijas.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Dzīvniekus pakļauj testa vielas iedarbībai, izmantojot piemērotu tās uzņemšanas veidu, un tad nogalina noteiktu laiku pēc apstrādes. Pirms nogalināšanas dzīvniekus apstrādā ar metafāzi apturošu vielu (piemēram, kolhicīnu vai *Colcemid*®). Tad no dzimumšūnām pagatavo hromosomu preparātus, ko iekrāso, un metafāzes šūnām nosaka hromosomu izmaiņas.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošana**

1.4.1.1. *Dzīvnieku sugu izvēle*

Parasti izmanto Ķīnas kāmju vai peļu tēviņus. Tomēr var izmantot arī citu piemērotu zīdītāju sugu tēviņus. Parasti izmanto jaunus, veselus, pieaugušus laboratorijas dzīvniekus. Izmēģinājuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām, un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējās masas.

1.4.1.2. *Turēšanas un barošanas nosacījumi*

Izmanto vispārējos nosacījumus, kas minēti Vispārīgā ievada B daļā, bet mitrumam vajadzētu būt 50 — 60 %.

1.4.1.3. *Dzīvnieku sagatavošana*

Veselus, jaunus, pieaugušus tēviņus pēc gadījuma izvēles principa sadala kontroles un apstrādes grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Katram dzīvniekam atsevišķi piešķir identifikāciju. Pirms izmēģinājumu sākuma, dzīvniekus laboratorijas apstākļiem aklimatizē vismaz piecas dienas.

1.4.1.4. *Devu sagatavošana*

Pirms došanas dzīvniekiem, cietas testa vielas vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var dozēt tieši vai pirms dozēšanas atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

1.4.2. **Testa apstākļi**

1.4.2.1. *Šķīdinātājs/nesējs*

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas iedarbības, un tas nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu. Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, vispirms ieteicams izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus.

1.4.2.2. *Kontroles*

Visos testos līdztekus iekļauj pozitīvas un negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) kontroles. Izņemot apstrādi ar testa vielu, ar kontroles grupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat, kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

Pozitīvā kontrolē iegūst spermatogonālo šūnu hromosomu struktūras izmaiņas *in vivo* pie ekspozīcijas robežvērtībām, kas dod nosakāmu palielinājumu virs fona līmeņa.

Pozitīvās kontroles vielu koncentrācijas izvēlas tā, lai to iedarbība būtu skaidri redzama, tomēr kodēto priekšmetstikliņu identitāti to nolasītājs nevarētu konstatēt uzreiz. Pieļaujams, ka pozitīvai kontrolei tiek izmantots cits iedarbības veids nekā testa vielai, un paraugu ņem tikai vienreiz. Ja iespējams, kā pozitīvās

kontroles vielas izmanto savienojumus, kas pieder pie atbilstošām vielu grupām. Pie pozitīvās kontroles vielām pieder:

Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.
ciklofosfamīds ciklofosfamīda monohidrāts	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
cikloheksilamīns	108–91–8	203–629–0
mitomicīns C	50–07–7	200–008–6
monomērs akrilamīds	79–06–1	201–173–7
trietilēnmelamīns	51–18–3	200–083–5

Ja nav pieņemamu vēsturisko kontroldatu par dzīvnieku savstarpējām atšķirībām un tādu šūnu parādīšanās biežumu, kurās ir hromosomu izmaiņas, katrā paraugu ņemšanas laikā iekļauj negatīvas kontroles dzīvniekus, ko apstrādā tikai ar šķīdinātāju vai nesēju, bet citādi ar kontroles grupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat, kā ar apstrādes grupu dzīvniekiem. Turklāt jāizmanto arī tukšie mēģinājumi, izņemot gadījumus, kad ir iepriekš iegūti vēsturiski vai publicēti kontroldati, kas skaidri parāda, ka izvēlētajam šķīdinātājam/nesējam nav kaitīgas vai mutagēnas iedarbības.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Dzīvnieku skaits**

Apstrādes un kontroles grupās iekļauj vismaz piecus pārbaudāmus tēviņus.

1.5.2. **Apstrādes shēma**

Testa vielas vēlams ievadīt vienreiz vai divreiz (t.i., vienā paņēmienā vai divos paņēmienos). Testa vielas devu var dot arī dalīti, t.i., divreiz vienā un tajā pašā dienā ik pēc dažām stundām, kas var būt vajadzīgs gadījumos, kad jādod liels vielas tilpums. Citiem devu režīmiem jābūt zinātniski pamatotiem.

No grupas, kurā pārbauda lielāko devu, paraugus pēc apstrādes ar vielu ņem divos termiņos. Tā kā testa viela var ietekmēt šūnas cikla kinētiku, agrākais paraugu ņemšanas termiņš ir apmēram 24 stundas pēc iedarbības ar to, bet vēlākais termiņš — aptuveni 48 stundas pēc apstrādes. No pārējām grupām paraugu ņemšanas termiņš ir 24 stundas vai 1,5 šūnu cikli pēc apstrādes ar testa vielu, izņemot gadījumus, kad iedarbības noteikšanai ir zināms paraugu ņemšanai piemērotāks termiņš (6).

Paraugus papildus var ņemt arī citos termiņos. Piemēram, pārbaudot vielas, kas var izraisīt hromosomu aizturi vai no S-neatkarīgu iedarbību, paraugi var būt jāņem agrākos termiņos (1).

Vajadzību atkārtot apstrādes shēmu nosaka atsevišķi katram konkrētam gadījumam. Izvēloties apstrādes shēmu, pēc kuras ar testa vielu iedarbojas atkārtoti, dzīvniekus nogalina 24 stundas (1,5 šūnu ciklus) pēc pēdējās apstrādes ar to. Vajadzības gadījumos paraugus papildus var ņemt arī citos termiņos.

Pirms nogalināšanas dzīvniekiem intraperitoniāli injicē atbilstošu devu metafāzi apturošas vielas (piemēram, *Colcemid*® vai kolhicīnu). Pēc tam ar atbilstošiem intervāliem no dzīvniekiem ņem paraugus. Pelēm šis intervāls ir aptuveni 3-5 stundas, bet Ķīnas kāmjiem apmēram 4-5 stundas.

1.5.3. **Devu lielums**

Ja atbilstošu datu trūkuma dēļ vispirms veic orientējošu izmēģinājumu, tas jāizdara tajā pašā laboratorijā, kurā veiks galveno izmēģinājumu, izmantojot tās pašas sugas un līnijas dzīvniekus, un ievērojot tādu pašu apstrādes režīmu (7). Ja viela ir toksiska, pirmajā paraugu ņemšanas reizē izmanto trīs devas. Šo devu intervālā ietver maksimāli toksiskās devas, kā arī vielas maztoksiskās vai netoksiskās devas. Vēlākajā paraugu ņemšanas laikā jāizmanto tikai lielākā deva. Kā lielāko nosaka devu, kurai ir tādas pašas toksiskās iedarbības pazīmes, kā lielākajai devai, kam varētu būt letāla iedarbība pēc tāda paša devu režīma.

Vielām ar specifisku bioloģisko aktivitāti maztoksiskās un netoksiskās devās (piemēram, hormoniem un mitogēniem) var būt citi devu noteikšanas kritēriji, ko katrā konkrētā gadījumā izvērtē atsevišķi. Kā lielāko var noteikt arī devu, kas liecina par toksisku iedarbību uz spermatogonālajām šūnām (piemēram, lielāku par tādu devu, kas pirmajā un otrajā mejozes metafāzē izraisa spermatogonālās mitozes samazināšanos; tā nedrīkst pārsniegt 50 %).

1.5.4. **Iedarbības robežu tests**

Ja testā ar vienu vielas devu, kas ir vismaz 2 000 mg/kg ķermeņa svara, vienā paņēmienā vai divos paņēmienos vienā dienā, toksisku iedarbību nekonstatē, un pēc datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām var pamatoti uzskatīt, ka tā nav genotoksiska, pilnīgus izmēģinājumus ar trim vielas devām var uzskatīt par nevajadzīgiem. Paredzamā iedarbība uz cilvēku var norādīt uz to, ka devu iedarbības robežu pārbaudē jālieto lielāka deva.

1.5.5. **Devu došana**

Testa vielu parasti ievada ar mākslīgo barošanu, izmantojot kuņģa caurulīti, piemērotu inkubācijas kanulu vai intraperitonālas injekcijas veidā. Var izmantot arī citus iedarbības veidus, ja šādai rīcībai ir pietiekams pamatojums. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var dot, mākslīgi barojot vai injicējot, ir atkarīgs no izmēģinājumu dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Lielāka tilpuma lietošana par šo ir jāpamato. Izņemot kairinošas un kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, izmēģinājumiem lietotā tilpuma mainības ietekmi samazina, koriģējot tilpumu tā, lai pie visām devām tas būtu vienāds.

1.5.6. **Hromosomu sagatavošana**

Tūliņ pēc nogalināšanas no viena vai abiem sēkliniekiem iegūst šūnu suspensijas, ko apstrādā ar hipotonisku šķīdumu un fiksē. Tad šūnas uznes uz priekšmetstikliņiem un iekrāso.

1.5.7. **Analīze**

No katra dzīvnieka analizē vismaz 100 labi izveidojušās metafāzes (t.i., vismaz 500 metafāzes no grupas). Šo skaitli var samazināt gadījumos, kad novēro lielu skaitu hromosomu izmaiņu. Visus priekšmetstikliņus, arī pozitīvas un negatīvas kontroles priekšmetstikliņus, pirms mikroskopiskās analīzes kodē. Tā kā priekšmetstikliņu sagatavošanas procedūrā bieži tiek bojātas metafāzes šūnas, zaudējot hromosomas, uzskaitāmajās šūnās jābūt centromēru skaitam, kas vienāds ar 2n ± 2.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Datus par katru dzīvnieku apkopo tabulas veidā. Eksperimenta vienība ir viens dzīvnieks. Katram dzīvniekam nosaka šūnu skaitu, kurās ir hromosomu struktūras izmaiņas, kā arī hromosomu izmaiņu skaitu uz vienu šūnu. Uzskaita dažāda veida hromosomu struktūras izmaiņas, norādot to skaitu un biežumu gan apstrādātajām grupām, gan kontrolgrupām. Pārrāvumus uzskaita un norāda atsevišķi, bet kopējā izmaiņu biežumā tos parasti neiekļauj.

Ja novēro gan mitozi, gam mejozi, iespējamās citotoksiskās iedarbības novērtēšanai un citotoksiskuma raksturošanai visiem apstrādes un negatīvas kontroles dzīvniekiem no 100 šūnām, kas dalās, nosaka spermatogonālo mitožu skaita attiecību pret pirmo un otro mejotisko metafāžu skaitu. Gadījumos, kad novēro tikai mitozi, katram dzīvniekam no vismaz 1 000 šūnām nosaka mitotisko indeksu.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvu rezultātu nosaka pēc vairākiem kritērijiem, piemēram, ar devu saistītu to šūnu daļas palielināšanos, kurās ir hromosomu struktūras izmaiņas, vai izmainītu šūnu skaita palielināšanos, pārbaudot vienu devu ar vienu paraugu ņemšanas laiku. Vispirms rezultātus izvērtē bioloģiski. Kā palīglīdzekli izmēģinājumu rezultātu novērtēšanai var izmantot statistikas metodes (8). Statistiskais svarīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju. Apšaubāmus rezultātus pārbauda, veicot atkārtotu testu, turklāt vēlams mainīt eksperimenta apstākļus.

Uzskata, ka testa vielas mutagēnās īpašības nav konstatētas, ja tās testa rezultāti neatbilst iepriekšminētajiem kritērijiem.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Pozitīvi rezultāti spermatogonālo hromosomu izmaiņu testā *in vivo* liecina, ka testa viela izmēģinājumu dzīvnieku sugai izraisa hromosomu izmaiņas dzimumšūnās. Negatīvi rezultāti liecina, ka izmēģinājuma apstākļos testa viela izmēģinājumu dzīvnieku sugai nerada hromosomu izmaiņas dzimumšūnās.

Jāizvērtē iespējamība, ka testa viela vai tās metabolīti var sasniegt mērķaudus.

3. **ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA**

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai:

Šķīdinātājs/nesējs:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits un vecums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u.c.,

— dzīvnieku masa testa sākumā, katrā grupā norādot robežas, vidējo lielumu un standartnovirzi.

Testa apstākļi:

— devu intervāla noteikšanas izmēģinājuma rezultāti gadījumos, kad tas veikts,

— devu izvēles pamatojums,

— iedarbības veida izvēles pamatojums,

— informācija par testa vielas sagatavošanu,

— nogalināšanas termiņu pamatojums,

— testa vielas koncentrācijas (ppm) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā dienas devā (mg/kg ķermeņa masas) gadījumos, kad tas nepieciešams,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— metafāzes apturēšanai izmantojamās vielas identifikācija, tās koncentrācija un apstrādes ilgums,

— priekšmetstikliņu sagatavošanas metodes,

— izmaiņu uzskaites kritēriji,

— analizēto šūnu skaits no viena dzīvnieka,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti:

— toksicitātes pazīmes,

— mitotiskais indekss,

— spermatogonālās mitozes šūnu attiecība pret pirmās un otrās mejotiskās metafāzes šūnām,

— izmaiņu veids un skaits, ko norāda katram dzīvniekam atsevišķi,

— kopējais hromosomu izmaiņu skaits grupā,

— kopējais šūnu skaits ar hromosomu izmaiņām grupā,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— līdztekus veiktās negatīvās kontroles dati,

— līdzšinējie vēsturiskie negatīvas kontroles dati, norādot robežas, vidējās vērtības un standartnovirzes,

— līdztekus veiktās pozitīvās kontroles dati,

— ploīdijas izmaiņas, ja tās tiek novērotas.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

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

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

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

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

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

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

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

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

4. G PIELIKUMS

"B.39 NEPROGRAMMĒTAS DNS SINTĒZES *(UDS)* TESTS AR ZĪDĪTĀJU AKNU ŠŪNĀM *IN VIVO*

1. METODE

Šī metode ir ESAO TG 486 metodes "Neprogrammētas DNS sintēzes (*UDS*) tests ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo*" (1997) kopija.

1.1. IEVADS

Neprogrammētas DNS sintēzes (*UDS*) testā ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo* identificē testa vielas, kas izraisa DNS reparācijas ar tām apstrādāto dzīvnieku aknu šūnās (1)(2) (3).

Šis *in vivo* tests ir metode vielu genotoksiskās iedarbības pētīšanai aknās. Testā noteiktais rādītājs liecina par DNS bojājumiem un tiem sekojošām reparācijām aknu šūnās. Aknas parasti ir galvenā vieta, kurā notiek uzņemto vielu metabolisms. Tādējādi tā ir piemērota vieta DNS bojājumu noteikšanai *in vivo*.

Gadījumos, kad noskaidrots, ka testa viela mērķaudos nenonāk, šo testu neizmanto.

Neprogrammētu DNS sintēzi (*UDS*) novērtē, nosakot iezīmētu nukleozīdu uzņemšanu šūnās, kurās nenotiek programmēta (S-fāzes) DNS sintēze. Plašāk izmanto ar tritiju iezīmēta timidīna (^{3}H-TdR) uzņemšanas noteikšanu ar autoradiogrāfijas metodi. Neprogrammētas DNS sintēzes *in vivo* testam piemērotākās ir žurku aknas. Var izmantot arī citu orgānu audus, kas nav šīs metodes objekts.

Neprogrammētas DNS testa atbildes reakcijas noteikšana ir atkarīga no bojājuma vietā izgriezto un ievietoto DNS bāzu skaita. Tāpēc neprogrammētas DNS sintēzes tests ir īpaši noderīgs ķīmisko vielu izraisītu liela garuma reparāciju (no 20 līdz 30 bāzes) noteikšanai. Savukārt maza garuma reparāciju (viena līdz trīs bāzes) noteikšanas jutība ir ievērojami zemāka. Turklāt mutācijas var notikt tādēļ, ka DNS bojājumu vietās reparācija nenotiek, tā notiek nepareizi, vai arī nepareizas replikācijas dēļ. Neprogrammētas DNS sintēzes testa atbildes reakcija neliecina par reparācijas procesa pareizību. Turklāt ir iespējams, ka mutagēns reaģē ar DNS, bet DNS bojājums izgriešanas reparācijas procesā izlabots netiek. Specifiskas informācijas trūkumu par neprogrammētas DNS sintēzes testā noteikto mutagēno aktivitāti kompensē šā rādītāja jutība, jo to nosaka visā genomā.

Skatīt arī Vispārīgā ievada B daļu.

1.2. DEFINĪCIJAS

Šūnas, kas atrodas reparācijas procesā: kopējā kodola graudainība, kura lielāka par iepriekšnoteikto, kas jāpamato laboratorijai, kura veic testu.

Kopējā kodola graudainība (NNG): šūnu neprogrammētas DNS sintēzes kvantitatīvs novērtējums autoradiogrāfiskos *UDS* testos, ko aprēķina, no kodola graudu skaita (NG) atņemot citoplazmas graudu skaitu kodoliem ekvivalentās citoplazmas zonās (CG): NNG = NG – CG. NNG skaitu aprēķina atsevišķām šūnām, ko pēc tam pārrēķina uz visām šūnām kultūrā, paralēlās kultūrās u.c.

Neprogrammēta DNS sintēze (*UDS*): DNS reparācijas sintēze pēc tāda DNS fragmenta izgriešanas un aizvadīšanas, kurā ir bojājums, kas radies ķīmiska vai fizikāla faktora iedarbības rezultātā.

1.3. TESTA METODES PRINCIPS

Neprogrammētas DNS sintēzes testā ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo* indicē DNS reparācijas sintēzi pēc tāda DNS fragmenta izgriešanas un aizvadīšanas, kurā ir bojājums, kas radies ķīmiska vai fizikāla faktora iedarbības rezultātā. Testā parasti izmanto ^{3}H-TdR iekļaušanu aknu šūnu DNS, jo tām šūnu ciklā ir maz šūnu S-fāzē. Parasti ^{3}H-TdR uzņemšanu nosaka ar autogrāfiju, jo to mazāk traucē S-fāzes šūnas, nekā, piemēram, šķidro scintilāciju skaitīšanu.

1.4. TESTA METODES APRAKSTS

1.4.1. **Sagatavošana**

1.4.1.1. *Dzīvnieku sugu izvēle*

Parasti izmanto žurkas, tomēr var izmantot jebkuras piemērotas sugas zīdītājus. Parasti izmanto jaunus, veselus, pieaugušus laboratorijas dzīvniekus. Izmēģinājuma sākumā dzīvnieku masas atšķirībām jābūt minimālām, un tās nedrīkstētu pārsniegt ± 20 % no vidējās masas, kas noteikta katram dzimumam atsevišķi.

1.4.1.2. *Turēšanas un barošanas nosacījumi*

Izmanto vispārējos nosacījumus, kas minēti Vispārīgā ievada B daļā, bet mitrumam vajadzētu būt 50 līdz 60 %.

1.4.1.3. *Dzīvnieku sagatavošana*

Veselus, jaunus, pieaugušus dzīvniekus pēc gadījuma izvēles principa sadala kontroles un apstrādes grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Dzīvniekiem piešķir īpašu identifikāciju, un līdz izmēģinājumu sākumam vismaz piecas dienas tur būros aklimatizācijai laboratorijas apstākļiem.

1.4.1.4. *Testa viela/preparāts*

Pirms došanas dzīvniekiem, cietas testa vielas vispirms izšķīdina vai suspendē piemērotos šķīdinātājos vai nesējos un, ja vajadzīgs, atšķaida. Šķidras testa vielas var dozēt tieši vai pirms dozēšanas atšķaidīt. Ja dati par testa vielu preparātu stabilitāti liecina, ka tos uzglabāt nevar, izmanto svaigi pagatavotus preparātus.

1.4.2. **Testa apstākļi**

1.4.2.1. *Šķīdinātājs/nesējs*

Lietotajās devās šķīdinātājam vai nesējam nedrīkst būt toksiskas iedarbības, un tas nedrīkst būt reaģētspējīgs ar testa vielu. Izmantojot citus, mazāk izpētītus šķīdinātājus vai nesējus, jābūt datiem par to saderību. Vienmēr, kad tas iespējams, vispirms ieteicams izmantot ūdeni saturošus šķīdinātājus vai nesējus.

1.4.2.2. *Kontroles*

Visās testu neatkarīgajās daļās līdztekus iekļauj pozitīvas un negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) kontroles. Izņemot apstrādi ar testa vielu, ar kontrolgrupu dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar apstrādāto grupu dzīvniekiem.

Pozitīvai kontrolei izmanto vielas, kuras izraisa neprogrammētu DNS sintēzi pie ekspozīcijas robežvērtībām, kas dod nosakāmu palielinājumu virs fona līmeņa. Pozitīvas kontroles vielas, kam vajadzīga metabolisma aktivācija, izmanto devās, kurām ir mērena atbildes reakcija (4). Pozitīvās kontroles vielu koncentrācijas izvēlas tā, lai to iedarbība būtu skaidri redzama, tomēr kodēto priekšmetstikliņu identitāti to nolasītājs nevarētu konstatēt uzreiz. Pie pozitīvās kontroles vielām pieder:

Paraugu ņemšanas laiks	Viela	CAS Nr.	Einecs Nr.
Agrīniem paraugu ņemšanas termiņiem (2 līdz 4 stundas)	N-nitrozodimetilamīns	62–75–9	200–249–8
Vēlīniem paraugu ņemšanas termiņiem (12 līdz 16 stundas)	N-2-fluorēnilacetamīds (2-AAF)	53–96–3	200–188–6

Var izmantot arī citas piemērotas pozitīvas kontroles vielas. Pieļaujams, ka pozitīvai kontrolei tiek izmantots cits iedarbības veids nekā testa vielai.

1.5. PROCEDŪRA

1.5.1. **Dzīvnieku skaits un dzimums**

Ņemot vērā dabiskās bioloģiskās reakcijas atšķirības uz testu, izmanto pietiekamu skaitu dzīvnieku. Katrā grupā jābūt vismaz trim analizējamiem dzīvniekiem. Gadījumos, kad uzkrāta ievērojama vēsturisko datu bāze, pozitīvās un negatīvās kontroles grupās var iekļaut tikai vienu vai divus dzīvniekus.

Ja izmēģinājuma veikšanas laikā ir pieejami citos izmēģinājumos iegūti dati par tās pašas sugas dzīvniekiem, kam izmantots tas pats iedarbības veids, un šie dati liecina, ka toksiskā iedarbība uz abu dzimumu īpatņiem būtiski neatšķiras, izmēģinājumam var izmantot tikai viena dzimuma dzīvniekus, vēlams tēviņus. Gadījumos, kad kaitīgā iedarbība uz cilvēka organismu katram dzimumam var būt atšķirīga, piemēram, dažiem farmaceitiskajiem preparātiem, izmēģinājumu veic ar attiecīgā dzimuma dzīvniekiem.

1.5.2. **Apstrādes shēma**

Ar testa vielām parasti veic vienreizēju apstrādi.

1.5.3. **Devu lielums**

Parasti lieto vismaz divas devas. Kā lielāko nosaka devu, kurai ir tādas pašas toksiskās iedarbības pazīmes kā lielākajai devai, kam varētu būt letāla iedarbība pēc tāda paša devu režīma. Parasti mazākā deva ir 50 % līdz 25 % no lielākas devas.

Vielām ar specifisku bioloģisko aktivitāti maztoksiskās un netoksiskās devās (piemēram, hormoniem un mitogēniem) var būt citi devu noteikšanas kritēriji, ko katrā konkrētā gadījumā izvērtē atsevišķi. Ja atbilstošu datu trūkuma dēļ vispirms veic orientējošu izmēģinājumu, tas jāizdara tajā pašā laboratorijā, kurā veiks galveno izmēģinājumu, izmantojot tās pašas sugas un dzimuma dzīvniekus un ievērojot tādu pašu apstrādes režīmu.

Kā lielāko var noteikt arī devu, kas liecina par toksisku iedarbību uz aknām (piemēram, piknotiskajiem kodoliem).

1.5.4. **Iedarbības robežu tests**

Ja testā ar vienu vielas devu, kas ir vismaz 2 000 mg/kg ķermeņa svara, vienā vai divos paņēmienos vienā dienā, toksisku iedarbību nekonstatē, un pēc datiem par struktūras ziņā līdzīgām vielām var pamatoti uzskatīt, ka tā nav genotoksiska, pilnīgi izmēģinājumi var būt nevajadzīgi. Paredzamā iedarbība uz cilvēku var norādīt uz to, ka devu iedarbības robežu pārbaudē jālieto lielāka deva.

1.5.5. **Devu došana**

Testa vielu parasti ievada ar mākslīgo barošanu, izmantojot kuņģa caurulīti vai piemērotu intubācijas kanulu. Var izmantot arī citus iedarbības veidus, ja šādai rīcībai ir pietiekams pamatojums. Taču nav ieteicams intraperitoniāls iedarbības veids, jo tādējādi aknas testa vielas iedarbībai var tikt pakļautas tieši, nevis caur centrālās asinsrites sistēmu. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var dot, mākslīgi barojot vai injicējot, ir atkarīgs no izmēģinājumu dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 2 ml uz 100 g ķermeņa masas. Lielāka tilpuma lietošana par norādīto ir jāpamato. Izņemot kairinošas un kodīgas vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, izmēģinājumiem lietotā tilpuma mainības ietekmi samazina, koriģējot tilpumu tā, lai pie visām devām tas būtu vienāds.

1.5.6. **Aknu šūnu sagatavošana**

Parasti aknu šūnas no apstrādātajiem dzīvniekiem sagatavo 12 līdz 16 stundu laikā pēc testa vielas ievadīšanas. Gadījumos, kad pēc 12 līdz 16 stundām netiek konstatēta acīmredzama pozitīva atbildes reakcija, var būt nepieciešams ņemt papildus paraugu ņemšana agrīnākos termiņos (parasti divas līdz četras stundas pēc apstrādes). Paraugus var ņemt citos termiņos gadījumos, kad tie ir pamatoti ar toksikokinētiskajiem datiem.

Zīdītāju aknu šūnu īslaicīgas kultūras iegūst, aknas *in situ* apstrādājot ar kolagenāzi, un tikko disociējušajām aknu šūnām ļaujot nostiprināties uz piemērotas virsmas. No negatīvās kontroles dzīvniekiem iegūto aknu šūnu dzīvotspējai (5) jābūt vismaz 50 %.

1.5.7. **Neprogrammētas DNS sintēzes noteikšana**

Tikko izolētas zīdītāju aknu šūnas noteiktu laiku, piemēram, trīs līdz astoņas stundas, parasti inkubē barotnē, kas satur ^{3}H-TdR. Inkubēšanas perioda beigās barotni atdala no šūnām, kuras pēc tam var inkubēt barotnē, kas nesaistītas radioaktivitātes samazināšanai satur neiezīmētu timidīnu. Tad šūnas skalo, fiksē un žāvē. Ja inkubēšanas laiks ir ilgāks, nesaistītas radioaktivitātes samazināšana var nebūt vajadzīga. Priekšmetstikliņus iemērc autoradiogrāfijas emulsijā, tumsā eksponē (piemēram, 7 līdz 14 dienas ledusskapī), attīsta, iekrāso un saskaita eksponētos sudraba graudiņus. No katra dzīvnieka sagatavo divus vai trīs priekšmetstikliņus.

1.5.8. **Analīze**

Pareizai neprogrammētas DNS sintēzes novērtēšanai uz priekšmetstikliņiem sagatavotajos preparātos jābūt pietiekamam morfoloģiski normālu šūnu skaitam. Preparātos mikroskopiski nosaka acīmredzama citotoksicitātes pazīmes (piemēram, piknozi, pazeminātu radioaktīvas iezīmēšanas līmeni).

Priekšmetstikliņus pirms graudiņu skaitīšanas kodē. Parasti no viena dzīvnieka uz vismaz diviem priekšmetstikliņiem uzskaita 100 šūnas; skaits, kas mazāks par 100 šūnām no viena dzīvnieka, ir jāpamato. Graudiņus neskaita S-fāzes kodolos, bet var atzīmēt S-fāzes šūnu daļu.

Ar piemērotām metodēm pēc sudraba graudiņu izgulsnēšanās nosaka morfoloģiski normālu šūnu kodolos un citoplazmā ietvertā ^{3}H-TdR daudzumu.

2. **DATI**

2.1. REZULTĀTU APSTRĀDE

Atsevišķi norāda datus par katru priekšmetstikliņu un dzīvnieku. Turklāt visus datus apkopo tabulas veidā. Katrai šūnai, katram dzīvniekam un katrai testa vielas devai atsevišķi aprēķina kopējo kodola graudainību (NNG), no kodola graudu skaita (NG) atņemot citoplazmas graudu skaitu kodoliem ekvivalentās citoplazmas zonās (CG). Gadījumos, kad uzskaita šūnas ar reparācijām, pamato to noteikšanas kritērijus, izmantojot iepriekš iegūtus vēsturiskos datus vai līdztekus veiktas negatīvas kontroles rezultātus. Skaitlisko rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes. Gadījumos, kad izmanto statistiskos testus, tos izvēlas un pamato pirms izmēģinājuma veikšanas.

2.2. REZULTĀTU NOVĒRTĒŠANA UN INTERPRETĀCIJA

Pozitīvas un negatīvas atbildes reakcijas noteikšanas kritēriji ir:

tests ir pozitīvs, ja	i)	kopējā kodola graudainība (NNG) pārsniedz pēc laboratorijas vēsturiskajiem datiem iepriekš noteikto robežvērtību;
vai	ii)	kopējā kodola graudainība (NNG) ir būtiski lielāka par vienlaicīgā kontrolē noteikto vērtību;
tests ir negatīvs, ja	i)	kopējā kodola graudainība (NNG) nepārsniedz pēc laboratorijas vēsturiskajiem datiem iepriekš noteikto robežvērtību;
vai	ii)	kopējā kodola graudainība (NNG) nav būtiski lielāka par vienlaicīgā kontrolē noteikto vērtību.

Iegūtos rezultātus izvērtē no bioloģiskā viedokļa: t.i., to variācijas starp atsevišķiem dzīvniekiem, ņemot vērā devu ietekmi uz citotoksiskajām īpašībām. Kā palīglīdzekli testa rezultātu izvērtēšanai var izmantot statistikas metodes. Statistiskais svarīgums nedrīkst būt vienīgais faktors, pēc kā nosaka pozitīvu atbildes reakciju.

Lai gan lielākajā daļā eksperimentu iegūst nepārprotami pozitīvus vai negatīvus rezultātus, tomēr dažkārt pēc iegūtajiem datiem nevar noteikti spriest par testa vielas aktivitāti. Turklāt rezultāti var būt nedroši vai apšaubāmi arī neatkarīgi no eksperimenta atkārtojumu skaita.

Pozitīvs rezultāts neprogrammētas DNS sintēzes testā ar zīdītāju aknu šūnām *in vivo* norāda, ka testa viela izraisa tādus DNS bojājumus zīdītāju aknu šūnās *in vivo*, ko var reparēt neprogrammētā DNS sintēzē *in vitro*. Negatīvi rezultāti liecina, ka izmēģinājuma apstākļos testa viela neizraisa šajā testā nosakāmus DNS bojājumus.

Jāizvērtē iespējamība, ka testa viela sasniedz centrālās asinsrites sistēmu un jo īpaši mērķaudus (piemēram, sistēmiska toksicitāte).

3. ZIŅOJUMU SASTĀDĪŠANA

TESTA ZIŅOJUMS

Testa ziņojumā jābūt šādai informācijai:

Šķīdinātājs/nesējs:

— nesēja izvēles pamatojums,

— testa vielas šķīdība un stabilitāte šķīdinātājā/nesējā, ja tā ir zināma.

Testa dzīvnieki:

— izmantotā suga/līnija,

— dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,

— izcelsme, turēšanas apstākļi, barība u.c.,

— dzīvnieku masa testa sākumā, katrā grupā norādot robežas, vidējo lielumu un standartnovirzi.

Testa apstākļi:

— pozitīvas un negatīvas (nesēja/šķīdinātāja) kontroles,

— devu intervāla noteikšanas testa rezultāti gadījumos, kad tas veikts,

— devu izvēles pamatojums,

— informācija par testa vielas sagatavošanu,

— informācija par testa vielas došanu,

— iedarbības veida izvēles pamatojums,

— metodes, ar kurām nosaka, ka testa viela nonākusi centrālajā asinsritē vai mērķaudos gadījumos, kad tas nepieciešams,

— testa vielas koncentrācijas (ppm) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā dienas devā (mg/kg ķermeņa masas) gadījumos, kad tas nepieciešams,

— sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti,

— sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts,

— toksicitātes novērtēšanas metodes,

— aknu šūnu preparātu un kultūru sagatavošanas metode,

— izmantotā autoradiogrāfiskā metode,

— sagatavoto priekšmetstikliņu un uzskaitīto šūnu skaits,

— novērtējuma kritēriji,

— kritēriji, pēc kuriem novērtē, vai testa rezultāts ir pozitīvs, negatīvs vai neskaidrs.

Rezultāti:

— kodolu graudainības, citoplazmas graudainības un kopējās kodola graudainības vidējie rādītāji atsevišķiem priekšmetstikliņiem, dzīvniekiem un grupām,

— ja iespējams, reakcijas uz devu novērtējums,

— statistiskās analīzes rezultāti, ja tā veikta,

— toksicitātes pazīmes,

— līdztekus iegūtie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti,

— līdzšinējie vēsturiskie negatīvas (šķīdinātāja/nesēja) un pozitīvas kontroles rezultāti, norādot robežas, vidējos lielumus un standartnovirzes,

— reparācijas šūnu skaits, ja ir noteikts,

— S-fāzes šūnu skaits, ja ir noteikts,

— šūnu dzīvotspēja.

Rezultātu izvērtējums.

Secinājumi.

4. **ATSAUCES**

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

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

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

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

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

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

5. PIELIKUMS

Sk. Komisijas Direktīvu 2001/59/EK, OV L 225, 21.8.2001., 1. lpp.

6. PIELIKUMS

"IX PIELIKUMS

A DAĻA

Noteikumi, kas attiecas uz bērniem nepieejamu aizdari

Papildus šīs direktīvas 22. panta 1. punkta e) apakšpunkta noteikumiem, jebkuras ietilpības konteineriem, kuros ir vielas, kas rada draudus, tās ieelpojot (Xn; R65), un ko klasificē un marķē saskaņā ar šīs direktīvas VI pielikuma 3.2.3. punktu, izņemot vielas, kuras laiž tirgū aerosolu formā vai traukā ar noslēdzamu smidzināšanas ierīci, jābūt aprīkotiem ar bērniem nepieejamu aizdari.

1. *Atverams un no jauna aizverams iepakojums*

   Atverama un jauna aizverama iepakojuma bērniem nepieejama aizdare atbilst *ISO* standartam 8317 (1989. gada 1. jūlija redakcija) "Bērniem nepieejama aizdare — Atveramam un jauna aizveramam iepakojumam noteiktās prasības un testa metodes", ko pieņēmusi Starptautiskā standartizācijas organizācija (*ISO*).

2. *Atverams un no jauna neaizverams iepakojums*

   Atverama un jauna neaizverama iepakojuma bērniem nepieejama aizdare atbilst *CEN* standartam EN 862 (1997. gada marta redakcija) "Iepakojums — Bērniem nepieejams iepakojums — Atveramam un jauna neaizveramam iepakojumam, ko izmanto nefarmaceitiskiem produktiem, noteiktās prasības un testa procedūras", ko pieņēmusi Eiropas Standartizācijas Komiteja (*CEN*).

3. *Piezīmes*

   1. Atbilstību iepriekšminētajiem standartiem var apliecināt tikai laboratorijas, kas atbilst EN 45 000 sērijas Eiropas standartos noteiktajām prasībām.

   2. Īpaši gadījumi

      Tests nav jāveic gadījumos, kad iepakojums ir bērniem pietiekami drošs, jo tie nevar piekļūt tā saturam, neizmantojot kādu ierīci vai instrumentu.

      Visos pārējos gadījumos, ja ir pietiekams pamats apšaubīt, ka aizdare ir bērniem nepieejama un pietiekami droša, valsts iestāde personai, kas ir atbildīga par produkta laišanu tirgū, var pieprasīt sertifikātu, ko izdevusi 3.1. punktā minētā laboratorija un kurā ir norādīts, ka:

      — aizdares tips ir tāds, ka tas nav jātestē saskaņā ar minēto *ISO* vai *CEN* standartu,

        vai

      — ir veikts aizdares tests, kurā konstatēts, ka tā atbilst iepriekš minētajiem standartiem.

B DAĻA

Noteikumi, kas attiecas uz sataustāmajām brīdinājuma ierīcēm

Tehniskās specifikācijas, kas attiecas uz sataustāmajām brīdinājuma ierīcēm, atbilst standartam EN *ISO* 11683 (1997) "Iesaiņojums — Sataustāmās brīdinājuma ierīces — Prasības"."