32000L0032

8.6.2000 *DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH* L 136/1

DYREKTYWA KOMISJI 2000/32/WE
z dnia 19 maja 2000 r.
dostosowująca po raz dwudziesty szósty do postępu technicznego dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych (*)

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 67/548/EWG z dnia 27 czerwca 1967 r. w sprawie zbliżenia przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych [1], ostatnio zmienioną dyrektywą Parlamentu Europejskiego i Rady 1999/33/WE [2], w szczególności jej art. 28,

a także mając na uwadze, co następuje:

(1) Załącznik I do dyrektywy 67/548/EWG zawiera wykaz substancji niebezpiecznych, razem z danymi szczegółowymi dotyczącymi klasyfikacji oraz etykietowania każdej substancji. Obecny stan wiedzy naukowo-technicznej wskazał, że wykaz substancji niebezpiecznych zawarty w wyżej wymienionym załączniku powinien zostać dostosowany. Niektóre wersje językowe dyrektywy wymagają poprawek w sekcjach szczególnych przedmowy oraz w tabeli A załącznika I.

(2) Załącznik III do dyrektywy 67/548/EWG zawiera wykaz zwrotów określających charakter specjalnego zagrożenia, jakie stanowią substancje i preparaty. Załącznik IV do dyrektywy 67/548/EWG zawiera wykaz zwrotów określających warunki bezpiecznego stosowania niebezpiecznych substancji i preparatów. Załącznik VI do dyrektywy 67/548/EWG zawiera przewodnik po klasyfikacji i etykietowaniu niebezpiecznych substancji i preparatów. Niektóre wersje językowe wymagają dokonania sprostowania w szczególnych sekcjach załączników III, IV oraz VI.

(3) Załącznik V do dyrektywy 67/548/EWG ustanawia metody określania właściwości fizyczno-chemicznych, toksyczności oraz ekotoksyczności substancji i preparatów. Niezbędne jest dostosowanie tego załącznika do postępu technicznego.

(4) Załącznik IX do dyrektywy 67/548/EWG zawiera przepisy odnoszące się do zamknięć zabezpieczających przed dostępem dzieci. Przepisy te powinny zostać dostosowane oraz zaktualizowane. Niezbędne jest rozszerzenie zakresu wykorzystania zamknięć zabezpieczających przed dostępem dzieci.

(5) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Komitetu ds. Dostosowania do Postępu Technicznego Dyrektyw w celu Usunięcia Barier Technicznych w Handlu Niebezpiecznymi Substancjami i Preparatami,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

W dyrektywie 67/548/EWG wprowadza się następujące zmiany:

1. W załączniku I wprowadza się następujące zmiany:

   a) Uwaga Q w załączniku 1A do niniejszej dyrektywy zastępuje odpowiadającą jej uwagę w przedmowie.

   b) Wiersze w załączniku 1B do niniejszej dyrektywy zastępują odpowiadające im wiersze w Tabeli A.

   c) Wpisy w załączniku 1C do niniejszej dyrektywy zastępują odpowiadające im wpisy.

   d) Dodaje się wpisy z załącznika 1D do niniejszej dyrektywy.

2. Zwrot dotyczący zagrożenia w załączniku 2 do niniejszej dyrektywy zastępuje odpowiadający mu zwrot w załączniku III.

3. W załączniku IV wprowadza się następujące zmiany:

   a) Zwroty dotyczące bezpieczeństwa w załączniku 3A do niniejszej dyrektywy zastępują odpowiadające im zwroty z załącznika IV.

(*) Przyjęta po dwudziestym siódmym dostosowaniu.
(1) Dz.U. 196 z 16.8.1967, str. 1.
(2) Dz.U. L 199 z 30.7.1999, str. 57.

b) Połączone zwroty dotyczące bezpieczeństwa w załączniku 3B do niniejszej dyrektywy zastępują odpowiadające im zwroty znajdujące się w załączniku IV.

4. W części B załącznika V wprowadza się następujące zmiany:

a) Tekst w załączniku 4A do niniejszej dyrektywy zastępuje rozdział B.10.

b) Tekst w załączniku 4B do niniejszej dyrektywy zastępuje rozdział B.11.

c) Tekst w załączniku 4C do niniejszej dyrektywy zastępuje rozdział B.12.

d) Tekst w załączniku 4D do niniejszej dyrektywy zastępuje rozdział B.13 oraz B.14.

e) Tekst w załączniku 4E do niniejszej dyrektywy zastępuje rozdział B.17.

f) Tekst w załączniku 4F do niniejszej dyrektywy zastępuje rozdział B.23. Zmienia się odpowiednio tytuł rozdziału B.23 w uwadze wyjaśniającej.

g) Dodaje się tekst w załączniku 4G do niniejszej dyrektywy.

5. W części C załącznika V skreśla się tiret czwarte ogólnego wprowadzenia.

6. Teksty w załączniku 5 do niniejszej dyrektywy zastępują odpowiadające im teksty w załączniku VI.

7. W załączniku IX wprowadza się zmiany zgodnie z załącznikiem 6 do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

1. Państwa Członkowskie wprowadzą w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy najpóźniej do dnia 1 czerwca 2001 r. i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Państwa Członkowskie określają, w jaki sposób dokonane ma być takie odniesienie.

2. Państwa Członkowskie przekażą Komisji teksty podstawowych przepisów prawa krajowego, przyjętych w dziedzinach objętych niniejszą dyrektywą oraz tabelę korelacji między niniejszą dyrektywą, a przyjętymi przepisami krajowymi.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie trzeciego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 19 maja 2000 r.

W imieniu Komisji

Margot WALLSTRÖM

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK 1A

PRZEDMOWA DO ZAŁĄCZNIKA I

Wyjaśnienie uwag odnoszących się do identyfikacji, klasyfikacji i etykietowania substancji

DA:

Note Q:

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

— en kortvarig biopersistensprøve ved inhalation har vist, at fibre, der er længere end 20 μm, har en vægtet halveringstid på mindre end 10 dage

— en kortvarig biopersistensprøve ved intratrakeal instillation har vist, at fibre, der er længere end 20 μm, har en vægtet halveringstid på mindre end 40 dage

— en egnet intra-peritoneal prøve ikke har vist kræftfremkaldende virkning, eller

— en egnet langvarig inhalationsprøve ikke har vist relevante sygdomsfremkaldende virkninger eller neoplastiske forandringer.

SV:

Note Q:

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

— ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid inhalation har visat att fibrer längre än 20 μm har en viktad halveringstid på mindre än 10 dagar

— ett korttidstest för att bestämma den biologiska beständigheten vid intratrakeal instillation har visat att fibrer längre än 20 μm har en viktad halveringstid på mindre än 40 dagar

— ett lämpligt intraperitonealt test har inte givit belägg för förhöjd cancerogenitet

— frånvaro av relevant patogenitet eller neoplastiska förändringar i ett lämpligt långtids inhalationstest.

(Nie dotyczy wersji ES)

(Nie dotyczy wersji DE)

(Nie dotyczy wersji EL)

(Nie dotyczy wersji EN)

(Nie dotyczy wersji FR)

(Nie dotyczy wersji IT)

(Nie dotyczy wersji NL)

(Nie dotyczy wersji PT)

(Nie dotyczy wersji FI)

ZAŁĄCZNIK 1B

TABELA A

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

ZAŁĄCZNIK 1C

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
006–011–00–7	karbaryl (ISO) metylokabaminian 1-naftylu		200–555–0	63–25–2	Rakotw. Kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22–40–50 S: (2-)22–24–36/37–46–61		
006–013–00–8	metam sodowy (ISO) metyloditiokarbaminian sodu		205–293–0	137–42–8	Xn; R22 R31 C; R34 R43 N; R50–53	C;N R: 22–31–34–43–50/53 S: (1/2-)26–36/37/39–45–60–61		
006–015–00–9	diuron (ISO) 3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik		206–354–4	330–54–1	Rakotw. Kat. 3; R40 Muta. Kat. 3; R40 Xn; R22–48/22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–48/22–50/53 S:(2-)13–22–23–37–46–60–61		
006–016–00–4	propoksur (ISO) 2-metylokarbaminian2-izopropoksyfenylu		204–043–8	114–26–1	T;R25 N; R50–53	T;N R: 25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
006–017–00-X	aldikarb (ISO) 0-(metylokarbamoilo) oksym-2-metylo-2-(metylosylfanylo)propa-nalu		204–123–2	116–06–3	T+; R26/28 T; R24 N; R50–53	T+;N R: 24–26/28–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–018–00–5	aminokarb (ISO) metylokarbaminian 4-(dimetylamino)-3-tolilu		217–990–7	2032–59–9	T; R24/25 N; R50–53	T;N R: 24/25–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
006–019–00–0	dialat (ISO) diizoprpylotiokarbaminian S-2,3-dichloroalilu		218–961–1	2303–16–4	Rakotw. Kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)25–36/37–60–61		
006–020–00–6	barban (ISO) (3-chlorofenylo) karbaminian 4-chlorbut-2-yn 1-ylu		202–930–4	101–27–9	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn; N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–36/37–60–61		
006–023–00–2	merkaptodimetur (ISO) metiokarb N-metylokrabaminian 3,5-dimetylo-4-(metylotio)fenylu		217–991–2	2032–65–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)22–37–45–60–61		
006–024–00–8	proksan-sodowy (ISO) ditiokarbonian)-izoplopylu-S-sodu		205–443–5	140–93–2	Xn; R22 Xi; R38 N; R51–53	Xn; N R: 22–38–51/53 S:(2-)13-61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
006–026–00–9	karbofuran (ISO) N-metylokarbaminian 2, 2 -dimetylo- 2, 3-dihydrobenzofuran- 7-ylu		216–353–0	1563–66–2	T+; R26/28 N; R50–53	T+;N R: 26/28–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
006–028–00-X	dinobuton (ISO) węglan 2-sec-bytulo-4,6-dinitrofenylu-izopropylu		213–546–1	973–21–7	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
006–029–00–5	dioksakarb (ISO) N-metylokarbaminian2-(l, 3-dioksolan-2-ylo)fenylu		230–253–4	6988–21–2	T; R25 N; R51–53	T; N R: 25–51/53 S: (1/2-)37–45–61		
006–033–00–7	metoksuron (ISO) 3-(3-chloro-4-methoksyfenylo)-l, 1-dimetylomocznik		243–433–2	19937–59–8	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
006–034–00–2	pebulat (ISO) butylo(etylo) tiokarbaminian S-propylu		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	pirymikarb (ISO) N, N-dimetylokarbaminian 5,6-dimetylo-2-(dimetyloamino)pyrimi dyn-4-yl		245–430–1	23103–98–2	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2)22–37–45–60–61		
006–037–00–9	promekarb (ISO) N, N-dimetylokarbaminian 3-izopropylo-5-metylofenylu		220–113–0	2631–37–0	T; R25 N; R50–53	T; N R: 25–50/53 S: (1/2-)24–37–45–60–61		
006–038–00–4	sulfalat (ISO) dietyloditiokarbaminian 2-chloroallilu	E	202–388–9	95–06–7	Rakotw. Kat. 2; R45 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–22–50/53 S: 53–45–60–61		
006–039–00-X	trialat (ISO) diizopropylotiokarbaminian S-2,3,3-trichloroalilu		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-)24-3 7–60–61		
006–042–00–6	monuron (ISO) 3-(4-chlorofenylo)-1,1 -dimetylomocznik		205–766–1	150–68–5	Rakotw. Kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn; N R: 22–40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
006–043–00–1	monuron-TCA trichlorooctan 3-(4-chlorofenylo)-1,1 -dimetylomocznika		—	140–41–0	Xi; R36/38 Rakotw. Kat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 36/38–40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
006–045–00–2	metomyl (ISO) N-(metylokarbomoiloksy) acetoimidan metylu		240–815–0	16752–77–5	T+; R28 N; R50–53	T+;N R: 28–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
006–046–00–8	bendiokarb (ISO) N- metylokarbaminian 2,2-dimetylobenzeno-l, 3-dioksol-4-ilu		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	bufenokarb (ISO) mieszanina N-metylokabaminianu 3-(1-metylobutylo) fenylu i N-metylokarbaminianu 3-(1-etylopropylo) fenylu		—	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	etiofenokarb (ISO) N-metylokarbaminian 2-[(etetylosulfanylo) metylo] fenylu		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	Trichlorooctan fenuronu; fenuron-TCA; trichlorooctan 3-fenylo-1,1-dimetylomocznika		—	4482–55–7	Xi; R38 N; R50–53	Xi; N R: 38–50/53 S: (2-)60-61		
006–053–00–6	izoprokarb (ISO) N-metylokarbaminian 2-izopropylofenylu		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	mekakarbat (ISO) N-metylokarbaminian -4-(dimetyloamino)-3,3-dimetylofenylu		206–249–3	315–18–4	T+; R28 Xn; R21 N; R50–53	T+;N R: 21–28–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
006–057–00–8	nitrapiryna (ISO) 2-chloro-6-(trichlorometylo) pirydyna		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	oksykarboksyna (ISO) 4,4-ditlenek 2-metylo-5,6-dihydro-1,4-oksantiino-3-karboksyanilidu		226–066–2	5259–88–1	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)61		
006–069–00–3	tiofanat metylowy (ISO) l, 2-fenylenobis[4,4'-(3-tioksoallofanian)] dimetylu		245–740–7	23564–05–8	Muta. Kat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		
006–070–00–9	furmecycloks N-cycloheksylo-N-methoksy-2,5-dimetylo-3-furoamid		262–302–0	60568–05–0	Rakotw. Kat. 3; R40 N; R50–53	Xn; N R: 40–50/53 S: (2-)36/37–60–61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
006–088–00–7	benfurakarb (ISO) N-[2,2-dimetylo-2,3-dihydrobenzofuran-7-yloksykarbonylo-metylo)aminotio]-N-izopropylo -ß -alaninate		—	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-dimetylohydrazyna 1,1-dimetylohydrazyna	E	200–316–0	57–14–7	F; R11 Rakotw. Kat. 2; R45 T; R23/25 C; R34 N; R51–53	F; T; N R: 45–11–23/25–34–51/53 S: 53–45–61		
007–013–00–0	N, N-dimetylohydrazyna 1,2-dimetylohydrazyna	E	—	540–73–8	Rakotw. Kat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51–53	T; N R: 45–23/24/25–51/53 S: 53–45–61	C ≥ 25 %:T;R45–23/24/25 3 % ≤ C ≤ 25 %:T; R45–20/21/22 0,01 % ≤ C ≤ 30 %:T;R45	
009–003–00–1	Kwas fluorowodorowy… %	B	231–634–8	7664–39–3	T+; R26/27/28 C; R35	T+;C R: 26/27/28–35 S: (1/2-)7/9–26–36/37–45	C ≥ 7 %:T+;C; R26/27/28–35 1 % ≤ C ≤ 7 %:T; R23/24/25–34 0,1 % ≤C ≤ 1 %:Xn; R20/21/22–36/37/38	
015–039–00–9	Azynfos metylowy (ISO) ditiofosforan O, O-dimetylu-S -(4-okso 3,4-dihydrobenzeno[d]-1,2,3-triazyn-3-ylo)metylu		201–676–1	86–50–0	T+; R26/28 T; R24 R43 N; R50–53	T+;N R: 24–26/28–43–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
015–048–00–8	fention (ISO) tiofosforan O, O-dimetylu-O, 3-metylo-4-(metylosulfanylo)metylu		200–231–9	55–38–9	Muta. Kat. 3; R40 T; R23–48/25 Xn; R21/22 N; R50–53	T; N R: 21/22–23–40–48/25–50/53 S: (1/2-)36/37–45–60–61		
015–056–00–1	azynfos etylowy (ISO) ditiofosforan O, O-dietylu-S-(4-okso-3,4-dihydrobenzo[d]- 1,2,3-triazyn-3-ylo)metylu		220–147–6	2642–71–9	T+; R28 T; R24 N; R50–53	T+;N R: 24–28–50/53 S: (1/2-)28–36/37–45–60–61		
015–140–00–8	triazofos (ISO) tiofosforan O, O-dietylu-O-1-fenylo- 1H-1,2,4-triazol-3-ilu		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	dichlorek siarki		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	

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
016–014–00–5	tetrachlorek siarki		—	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	siarczan dimetylu	E	201–058–1	77–78–1	Rakotw. Kat. 2; R45 Muta. Kat. 3; R40 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45–25–26–34–43 S: 53-45	C ≥ 25 %:T+; R45–25–26–34–43 10 % ≤ C ≤ 25 %:T+; R45–22–26–34–43 7 % ≤ C ≤ 10 %:T+; R45–22–26–36/37/38–43 5 % ≤ C ≤ 7 %:T; R45–22–23–36/37/38–43 3 % ≤ C ≤ 5 %:T; R45–22–23–43 1 % ≤ C ≤ 3 %:T; R45–23–43 0,1 % ≤ C ≤ 1 %:T; R45–20 0,01 % ≤ C ≤ 0,1 %:T; R45	
016–024–00-X	dimeksan (ISO) ditiobis(tiomrówczan)-O, O-dimetylu		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	3-amino-6,13-dichloro-10-3-[4-chloro-6-(2-sulfofenyloamino)- 1,3,5-triazyn-2-yloamino] propyloamino		410–130–3	136248–03–8	R43	Xi R:43 S: (2-)22–24–37		
022–001–00–5	tetrachlorek tytanu		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	dimetylocynk [1] dietylocynk [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	cyheksatyna (ISO) wodorotlenek tri(cykloheksylo)cyny		236–049–1	13121–70–5	Xn; R20/21/22 N; R50–53	Xn; N R: 20/21/22–50/53 S:(2-)l 3–60–61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
050–012–00–5	tetracykloheksylostannan [1] chlorotricykloheksylostan nan [2] butylotricykloheksylostannan [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	fenbutacyny tlenek (ISO) tlenek bis[tris(2-fenylo-2-metylopropylo)cyny]		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	żółty sulfochromian ołowiu C. I. Pigment Yellow 34 [Substancja ta jest identyfikowana w Colour Index przez Colour IndexConstitution Number, C. I. 77603.]		215–693–7	1344–37–2	Rakotw. Kat. 3; R40 Repr. Kat. 1; R61 Repr. Kat. 3; R62 R33 N; R50–53	T; N R: 61–33–40–50/53–62 S: 53–45–60–61		1
082–010–00–5	czerwony chromian molibdenian siarczan ołowiu C. I. Pigment red 104. [Substancja ta jest identyfikowana w Colour Index przez Colour IndexConstitution Number, C. I. 77605.]		235–759–9	12656–85–8	Rakotw. Kat. 3; R40 Repr. Kat. 1; R61 Repr. Kat. 3; R62 R33 N; R50–53	T;N R: 61–33–40–50/53–62 S: 53–45–60–61		1
601–024–00-X	kumen [1] propylobenzen [2]		202–704–5 [1] 203–132–9 [2]	98–82–8 [1] 103–65–1 [2]	R10 Xn; R65 Xi; R37 N; R51–53	Xn; N R: 10–37–51/53–65 S: (2-)24–37–61–62		4
601–032–00–3	benzo[*a*]pireni benzo[*def*]chryzen		200–028–5	50–32–8	Rakotw. Kat. 2; R45 Muta. Kat. 2; R46 Repr. Kat. 2; R60–61 N; R50–53	T;N R: 45–46–60–61–50/53 S: 53–45–60–61		
601–034–00–4	benzo[*e*]acefenantrylen		205–911–9	205–99–2	Rakotw. Kat. 2; R45 N; R50–53	T; N R: 45–50/53 S: 53–45–60–61		
602–035–00–2	1,4-dichlorobenzen p-dichlorobenzen		203–400–5	106–46–7	Xi; R36 N; R50–53	Xi; N R: 36–50/53 S: (2-)24/25–46–60–61		
602–054–00–6	3-jodopropen; jodek alilu		209–130–4	556–56–9	R10 C; R34	C R: 10-34 S: (1/2-)7–26–45		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
603–076–00–9	but-2-yno-1,4-diol 2-butyne-1,4-diol		203–788–6	110–65–6	T; R23/25 Xn; R21–48/22 C;R34	T R: 21–23/25–34–48/22 S: (1/2-)26–36/37/39–45	C ≥ 50 %:T; R21–23/25–34–48/22 25 % ≤ C ≤ 50 %:T; R21–23/25–36/38–48/22 10 % ≤ C ≤ 25 %:Xn; R20/22–48/22 3 % ≤ C ≤ 10 %:Xn; R20/22	
603–091–00–0	egzo-4-izopropylo-1-metylo-1,4-epoksycykloheksan-2-ol; egzo-1-metylo-4-(1-metyloetylo)-7-oksabicyklo[2.2.1]heptan-2-ol		402–470–6	87172–89–2	O;R8 Xn; R22 Xi; R36	O;Xn R: 8–22–36 S: (2-) 26		
603–093–00–1	egzo-(+/-)-4-izopropylo-1-metylo-2-(2-metylo-benzyloksy)- 1,4-epoksycykloheptan		402–410–9	87818–31–3	Xn; R20 N; R51–53	Xn; N R: 20–51/53 S: (2-) 2 3-61		
603–097–00–3	1,1', l" - nitrylopropan-2-ol; triizopropanolamina		204–528–4	122–20–3	Xi; R36 R52–53	Xi R: 36–52/53 S: (2-)26-61		
603–117–00–0	propan-2-ol; alkohol izopropylowy; izopropanol		200–661–7	67–63–0	F; R11 Xi; R36 R67	F; Xi R: 11–36–67 S: (2-)7–16–24/25–26		6
604–020–00–6	bifenyl-2-ol; 2-hydroksybifenyl; 2-fenylofenol (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- fenylofenolan sodu; bifenyl-2-olan sodu		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' (4-metylopentano-2, 2-diylo)difenol; 4,4'-izobutyloetylideno difenol; 2,2-bis(4-hydroksyfenylo)-4-metylopentan		401–720–1	6807–17–6	Repr. Kat. 2; R60 Xi; R36 N; R50–53	T;N R: 60–36–50/53 S: 53–45–60–61		
604–041–00–0	acifluorfen [1]; acifluorfen sodowy[2]; kwas 5-(2-chloro-4-(trifluormetylo)-fenoksy]-2-nitrobenzoesowy [1]; 5-[2-chloro-4-(trifluor ometylo)fenoksy]-2-nitrobenzoesan sodu [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		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
604–043–00–1	eter benzylowo-4-hydroksyfenylowy; eter monobenzylowy hydrochinonu		203–083–3	103–16–2	Xi; R36 R43	Xi R: 36-43 S: (2-)24/25–26–37		
604–044–00–7	mequinol, 4- metoksyfenol; eter monometylowy hydrochinonu		205–769–8	150–76–5	Xn; R22 Xi; R36 R43	Xn R: 22–36–43 S: (2-)24/25–26–37/39–46		
605–016–00–7	glioksal… % etanodial… %	B	203–474–9	107–22–2	Muta. Kat. 3; R40 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20–36/38–40–43 S: (2-) 3 6/3 7	C ≥ 10 %:Xn; R20–36/38–40–43 1 % ≤ C ≤ 10 %:Xn; R40–43	
606–016–00-X	pindone (ISO); 2-piwaloiloindano– 1, 3-dion		201–462–8	83–26–1	T; R2 5–48/25 N; R50–53	T; N R: 25–48/25–50/53 S: (1/2-)37–45–60–61		
606–018–00–0	dichlon (ISO) 2, 3 -dichloro– 1,4-naftochinon		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	chlordekon (ISO); dekachloropentacyklo[5. 2.1.$0^{2,6}$.$0^{3,9}$.$0^{5,8}$]-dekan-4-on perchloropentacyklo[5.3.0.$0^{2,6}$.$0^{3,9}$.$0^{4,8}$]-dekan-5-on		205–601–3	143–50–0	Rakotw. Kat. 3; R40 T; R24/25 N; R50–53	T; N R: 24/25–40–50/53 S: (1/2-)22–36/37–45–60–61		
606–034–00–8	metrybuzyna (ISO); 4-amino-6-tert-butylo-3-metylotio-1,2,4-triazyn-5(4H)-on; 4-amino-6-(1,1-dimetyloetylo)-3-metylo-tio-4,5-dihydro-1,2,4-triazyn-5-on		244–209–7	21087–64–9	Xn; R22 N; R50–53	Xn;N R: 22–50/53 S: (2-)60-61		
606–035–00–3	chlorydazon (ISO) 5-amino-4-chloro-2-fenylopirydazyn-3(2H)-on		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	chinometionat (ISO) 6-metylo-1,3-ditiolano[4,5-b] chinoksalin-2-on		219–455–3	2439–01–2	Repr. Kat. 3; R62 Xn;R20/21/22–48/22 Xi; R36 R43 N; R50–53	Xn;N R: 20/21/22–36–43–48/22–50/53-62 S: (2-)24–37–60–61		
606–037–00–4	triadimefon (ISO); - (4-chlorofenoksy)-3,3-dimetylo-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ilo)butan-2-on		256–103–8	43121–43–3	Xn; R22 N;R51–53	Xn;N R: 22–51/53 S: (2-)61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
606–044–00–2	2,4,6-trimetylobenzofenon		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) kwas 2,5-dichloro-6-metoksyb enzoesowy; kwas 3,6-dichloro-2-metoksyb kwas 3,6-dichloro-o-anyżowy		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	kumachlor (ISO) 3-[1-(4-chlorofenylo)-3-oksobutylo]-4-hydroksy kumaryna		201–378–1	81–82–3	Xn; R48/22 R52–53	Xn R: 48/22–52/53 S: (2-) 3 7-61		
607–058–00–1	kumafuryl (ISO) 3- [1-(4-chlorofenylo)-3-oksobutylo]-4-hydroksy - 2-okso-2H-chromen; 3-[1-(4-chlorofenylo)-3-oksobutylo]-4-hydroksy kumaryna		204–195–5	117–52–2	T; R25–48/2 5 R52–53	T R: 25–48/25–52/53 S: (1/2-)37–45–61		
607–079–00–6	5-(1,2,4,5,6,7,8,8,9,10-dekachloro-3-hydroksyp entacyklo-[5.3.0^{2,6}.0^{4,0}.0^{5,9}]-dekan-3-ylo)-4-oksopentanian etylu; 5-(1,2,4,5,6,7,8,8,9,10-dekachloro-3-hydroksypentacyklo-[5.3.0$^{2.6}$.0 ^{4,0}0^{5,9}]-dekan-3-ylo)-4-oksowalerian etylu		—	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	1,2-bezwodnik kwasu benzeno-1,2,4-trikarboksylowego; bezwodnik trimelitowy		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	kwas walerianowy		203–677–2	109–52–4	C;R34 R52–53	C R: 34–52/53 S: (1/2-)26–36–45–61		
607–152–00–2	2,3,6-TBA (ISO); kwas 2,3,6-trichlorobenzoesowy		200–026–4	50–31–7	Xn; R22 N; R51–53	Xn;N R: 22–51/53 S: (2-)61		
607–153–00–8	benazolina (ISO) kwas 4-chloro-2-okso-2,3-dihydrobenzotiazol-3-ilooctowy		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	chlorfenson (ISO); 4-chlorobenzenosulfonian 4-chlorofenylu		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	sól sodowa kwasu chlorooctowego; chlorooctan sodowy		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		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
607–159–00–0	chlorobenzylat (ISO); bis (4-chlorofenylo)hydroksy octan etylu; 4,4'-dichlorobenzilan etylu		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	mieszanina: α-3-[3-(2H-benzotriazol-2-ilo)-5-tert-butylo-4-hydroksyfenylo]propionylo-ω-hydroksypoli(oksy etylenu) i α-3-[3-(2H-benzotriazol-2-ilo)-5-tert-butylo-4-hydroksyfenylo]-propionylo-ω-3-[3-(2H-benzotriazol-2-ilo)-5-tert-butylo-4-hydroksyfenylo]propionyloksypoli (oksyetylenu)		400–830–7	—	R43 N;R51–53	Xi;N R: 43–51/53 S: (2-) 3 6/3 7-61		
607–188–00–9	wodoro-3-[N-(2-karboksylanoetylo)-N-oktadek-9-enylokarbamoilo]-akrylan sodu		402–970–4	—	R43 N; R51–53	Xi;N R: 43–51/53 S: (2-) 24/3 7-61		
607–209–00–1	mieszanina pentatio)bistiomrówczanu, (tetratio)bistiomrówczanu i (tritio) bis-tiomrówczanu O, O'-diizopropylu(O, O'-di(1-melyloetylu))		403–030–6	—	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn;N R: 22–43–50/53 S: (2-) 3 6/3 7–60–61		
607–213–00–3	3,3-bis[(1,1-dimetylopr opylo)peroksy]-butanian etylu		403–320–2	67567–23–1	E; R2 O; R7 R10 N; R51–53	E; N R: 2–7–10–51/53 S: (2-)3/7–14–33–36/37/39–61		
607–217–00–5	2-(4-(2,6-diokso-7-fenylo-2,6-dihydro - 1,5-dioksaindacen-3-ylo)fenoksy]octan 2-etoksyetylu		403–960–2	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24–37–61		
607–243–00–7	3,6-dichloro-2-metoksybenzoesan sodu[1]; kwas 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesowy 3,6-dichloro-o-anyżowy), związek z 2,2'-iminodietanolem (1:1)[2]; kwas 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesowy(3,6-dichloro-o-anyżowy), związek z 2-aminoetanolem (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	naptalam-sodowy; N-1-naftyloftalamian sodu; sól sodowa kwasu N-1-naftyloftalamowego		205–073–4	132–67–2	Xn; R22	Xn R: 22 S:(2)		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
607–249–00-X	diakrylan (1-metyloetano-1,2-diylo)-bis[oksy(metyloetano-2,1-diylu)]; diakrylan glikolu tripropylenowego; TPGDA		256–032–2	42978–66–5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51–53	Xi;N R: 36/37/38–43–51/53 S: (2-)24–37–61	C ≥ 10 %:Xi; R36/37/38–43 1% ≤ C ≤ 10 %:Xi; R43	
607–252–00–6	lambda-cyhalotryna (ISO); mieszanina 1:1 (1RS, 3RS, a SR) i (1RS, 3RS, a RS) (Z)-(1RS, 3RS)-3-(2-chloro-3,3,3-tifluoropropenylo)- 2,2-dimetylocyklopropanokarboksylanu(SR)-a-cyjano-3-fenoksy-benzylu		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	fluroksypyr (ISO); kwas 4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pirydyloksyoctowy		—	69377–81–7	R52–53	R: 52/53 S: 61		
608–003–00–4	akrylonitryl	D E	203–466–5	107–13–1	F; R11 Rakotw. Kat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38–41 R43 N; R51–53	F;T;N R: 45–11–23-/24/25–37/38–41–43–51/53 S: 9–16–53–45–61	C ≥ 20 %:T; R45-23/24/25–37/38-41-43 10 % ≤ C ≤ 20 %:T; R45–23/24/25–41–43 5 % ≤ C ≤ 10 %:T; R45–23/24/25–36–43 1 % ≤ C< 5 %:T; R45–23/24/25–43 0,2 % ≤ C ≤ 1 %:T; R45–20/21/22 0,1 % ≤ C ≤ 0,2 %: T;R45	
608–016–00–5	1,4-dicyjano-2, 3, 5, 6-tetra-chlorobenzen		401–550–8	1897–41–2	R43 N; R50–53	Xi;N R: 43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
609–030–00–4	dinoterb (ISO); 2-tert-butylo-4,6-dinitrofenol	E	215–813–8	1420–07–1	Repr. Kat. 2; R61 T+; R28 T;R24 R44 N; R50–53	T+;N R: 61–24–28–44–50/53 S: 53–45–60–61		
609–040–00–9	nitrofen (ISO); eter 2,4-dichlorofenylowo-4-nitrofenylowy	E	217–406–0	1836–75–5	Rakotw. Kat. 2; R45 Repr. Kat. 2; R61 Xn; R22 N; R50–53	T;N R: 45–61–22–50/53 S: 53–45–60–61		
609–044–00–0	tecnazen (ISO); 1,2,4,5-tetrachloro-3-nitrobenzen		204–178–2	117–18–0	Xn; R22 R43 N; R50–53	Xn;N R: 22–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
611–008–00–4	4-aminoazobenzen 4-fenyloazoanilina		200–453–6	60–09–3	Rakotw. Kat. 2; R45 N; R50–53	T; N R: 45–50/53 S: 53–45–60–61		
611–013–00–1	1-hydroksy-7-(3-sulfonianoanilino)- 2–3-metylo-4-[2-metoksy-4-(3-sulfonianofenyloazo) fenyloazo]fenyloazonaftaleno-3-sulfonian trilitu		403–650–7	117409–78–6	E;R2 N;R51–53	E; N R: 2–51/53 S: (2-) 3 5-61		
611–031–00-X	C. I. Basic Red 9; Czerwień zasadowa 9; chlorowodorek 4,4'-(4-iminocykloheksa-2,5-dienylidenometyleno)dianiliny		209–321–2	569–61–9	Rakotw. Kat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612–035–00–4	2- metoksyanilina; o-anizydyna	E	201–963–1	90–04–0	Rakotw. Kat. 2; R45 Muta. Kat. 3; R40 T; R23/24/25	T R: 45–23/24/25 S: 53-45		
612–042–00–2	benzydyna; bifenylo-4,4'-diamina; bifenyl-4,4'-ylenodiamina; 4,4'-diaminobifenyl	E	202–199–1	92–87–5	Rakotw. Kat. 1; R45 Xn; R22 N; R50–53	T; N R: 45–22–50/53 S: 53–45–60–61	C ≥ 25 %:T; R45–22 0,01 % ≤ C ≤ 25 %:T; R45	
612–051–00–1	4,4'-metylenodianilina; 4,4'-diaminodifenylometan	E	202–974–4	101–77–9	Rakotw. Kat. 2; R45 Muta. Kat. 3; R40 T; R3 9/2 3/24/2 5Xn; 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	sole 4,4'-bi-o-toluidyny; sole 3,3'-dimetylobenzydyny; sole o-tolidyny	A E	210–322–5 265–294–7 277–985–0	612–82–8 64969–36–4 74753–18–7	Rakotw. Kat. 2; R45 Xn; R22 N; R51–53	T; N R: 45–22–51/53 S: 53–45–61		
612–099–00–3	4-metylo-1,3-fenylenodiamina; tolueno-2,4-diamina	E	202–453–1	95–80–7	Rakotw. Kat. 2; R45 T; R25 Xn; R21 Xi; R36 R43 N; R51–53	T; N R: 45–21–25–36–43–51/53 S: 53–45–61		
612–105–00–4	1-(2-aminoetylo)piperaz yna;		205–411–0	140–31–8	Xn, R21/22 C;R34 R43 R52–53	C R: 21/22–34–43–52/53 S: (1/2-)26–36/37/39–45–61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
612–111–00–7	2-metylo-1,3-fenylenodi amina; 2-metylo-m-fenylenodiamina; tolueno-2,6-diamina		212–513–9	823–40–5	Muta. Kat. 3; R40 Xn; R21/22 R43 N; R51–53	Xn;N R: 21/22–40–43–51/53 S: (2-)24–36/37–61		
612–125–00–3	2-metylo-1,4-fenylenodi amina; tolueno-2,5-diamina		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	flumetralina (ISO); N-(2-chloro-6-fluorobenzylo)-N-etylo-2,6-dinitro-4-trifluorometyloanilina		—	62924–70–3	Xi; R36/38 R43 N; R50–53	Xi;N R: 36/38–43–50/53 S: (2-) 3 6/3 7–60–61		
612–151–00–5	diaminotoluen	E	246–910–3	25376–45–8	Rakotw. Kat. 2; R45 T;R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N;R51–53	T;N R: 45–20/21–25–36–43–51/53 S: 53–45–61		
613–018–00–4	morfamkwat (ISO); 1,1'-bis(3,5-dimetylomorfolinokarbonylometylo) - 4,4'-bipirydynium		—	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	kwas trichloroizocyjanurowy; 1,3,5-trichloro-1,3,5-triazinano-2,4,6-trion; symklozen		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-fenylo-1,3,5-triazyno 2,4-diamina; 6-fenylo-1,3,5-triazyno- 2,4-diylodiamina; 2,4-diamino-6-fenylo-s-triazyna;		202–095–6	91–76–9	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)61		
613–042–00–5	imazalil (ISO) 1-[2-alliloksy-2-(2,4-d ichlorofenylo)etylo]-1H-imidazol N;		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	wodosiarczan(VI) imazalilu [1]; wodorosiarczan(VI) 1-[2-(alliloksy)-2-(2,4-dichlorofenylo)]- 1H-imidazolium [1]; wodorosiarczan(VI) (+/-)-1-[2-alliloksy-2–(2,4-dichlorofenylo)etylo]- 1H-imidazolium [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		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
613–066–00–6	terbumeton (ISO); 2-tert-butyloamino-4-etyloamino-6-metoksy-1,3,5-triazyna		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	dichlorek morfamakwatu [1], siarczan(VI) morfamakwatu [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-oktylo)-2-pirolidon		403–700–8	2687–94–7	C;R34 N;R51–53	C;N R: 34–51/53 S: (1/2-)23–26–36/37/39–45–61		
613–130–00–3	Heksakonazol (R, S) (ISO), (R, S)-2-(2,4-dichlorofenylo)-1-(1H-1,2,4-triazol-1 -ilo) heksan-2-ol		—	79983–71–4	R43 N;R51–53	Xi;N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
613–131–00–9	pyroxhilon (ISO); l, 2,5,6-tetrahydropyirolo[3,2, l-ij]chinolin-4-on		—	57369–32–1	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)61		
613–134–00–5	mychlobutanil (ISO); 2-(4-chlorofenyl)-2-(lH-l, 2,4-triazol-1 -ilometylo)hexanonitryl		—	88671–89–0	Repr. Kat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R36 N; R51–53	Xn;N R: 22–36–51/53–63 S: (2-)36/37–46–61		
613–137–00–1	metabenzotiazuron (ISO); 1-(1,3-benzotiazol-2-ilo)-1,3-dimetylomocznik		242–505–0	18691–97–9	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
613–139–00–2	metsulfuron-metylowy; methyl 2-(4-metoksy-6-metylo-1,3,5-triazyn-2-ylokarbamoilsulfamoilo)benzoesan metylu		—	74223–64–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
614–001–00–4	nicotyna (ISO) 3-(N-metylopirolidyn-2- ylo)pirydyna;		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	brucyna; 2,3-2,3-dimetoksystrychnina		206–614–7	357–57–3	T+; R26/28 R52–53	T+ R: 26/28–52/53 S:(1/2-)l 3–45–61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
614–007–00–7	siarczan(VI) brucyny[1], azotan(V) brucyny[2], 2,3-dimetoksystrychnidyn-10-on, związek zbenzeno-1,2-dikarboksylanem(R)-mono(1-metyloheptylu)[3]; 2,3-dimetoksystrychnidy n-10-on, związek zbenzeno-1,2-dikarboksylanem(S)-mono(1-metyloheptylu) (1:1) [4]		225–432–9 [1] 227–317–9 [2] 269–439–5 [3] 269–710–8 [4]	4845–99–2 [1] 5786–97–0 [2] 68239–26–9 [3] 68310–42–9 [4]	T+; R26/28 R52–53	T+ R: 26/28–52/53 S:(1/2-)l 3–45–61		
615–006–00–4	diizocyjanian tolueno-2,6-diylu[1]; diizocyjanian 2-metylo-diizocyjaniantolueno-2,4-diylu[2];m-fenylenu[1], diizocyjanian 4-metylo-m-fenylenu[2],toluilenodiizocyjanian[3]; TDI[3];diizocyjanian toluenu [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]	Rakotw. Kat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52–53	T+ R: 26–36/37/38–40–42/43–52/53 S: (1/2-)23–36/37–45–61	C ≥ 20 %:T+; R26–36/37/38–40–42/43 7 % ≤ C ≤ 20 %:T+; R26–40–42/43 1 % ≤ C ≤ 7 %:T; R23–40–42/430, l % ≤ C ≤ l %:Xn; R20–42	2
616–010–00–9	chloroamina T (sól sodowa)		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	pirakarbolid (ISO); 6-metylo-3,4-dihydro-2H-pirano-5-karboksyanilid		246–419–4	24691–76–7	R52–53	R: 52/53 S: 61		
616–035–00–5	cymoxanil 2-cyano-N-[(ethylamino)carbonyl]-2-(methoxyimino)acetamide		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	hydronadtlenek 1,2,3,4-tetrahydro-1-naftylu;		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	nadtlenek bis(α, α-dimetylobenzylowy);		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	nadtlenek dibenzoilowy nadtlenek benzoilowy		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	chlordimeform (PN); N^2 - (4-chloro-2-metylofenylo)-N^1,N-dimetyloformamidyna		228–200–5	6164–98–3	Rakotw. Kat. 3; R40 Xn; R21/22 N; R50–53	Xn;N R: 21/22–40–50/53 S: (2-)22–36/37–60–61		

Nr indeksu	Nazwa związku chemicznego	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
650–008–00–9	drazoksolon (PN); 4-(2-chlorofenylohydrazono)-3-metylo-izoksazol-5-on		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	chlorowodorek chlordimeformu; chlorowodorek (monochlorowodorek) N^2 - (4-chloro-2-metylofenylo) N^1, N^1 - dimetyloform amidyny		243–269–1	19750–95–9	Rakotw. Kat. 3; R40 Xn; R22 N; R50–53	Xn;N R: 22–40–50/53 S: (2-)22–36/37–60–61		
650–033–00–5	esfenwalerat (PN); (S)-2-(4-chlorofenylo)-3-metylobutanian(S)-a-cyjano-3-fenoksybenzylu; (S)-2-(4-chlorofenylo)-3-metylobutanian		—	66230–04–4	T; R23/25 R43 N; R50–53	T;N R: 23/25–43–50/53 S: (1/2-)24–36/37/39–45–60–61		
650–041–00–9	triasulfuron (PN); 1-[2-(2-chloroetoksy)fenylosulfonylo]-3-(4-metoksy-6-metylo-1,3,5-triazyn-2-ylo)mocznik		—	82097–50–5	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		

ZAŁĄCZNIK 1D

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
006–090–00–8	2-(3-jodoprop-2-yn-1-yloksy)etylu; fenylokarbamian2-(3-jodoprop-2-yn-1-yloksy)etylu		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	mieszanina 1,3-di(heks-5-en– 1-ylo)-1,1,3,3-tetramety lodisiloksanu i 1,3-di(heks-n-en-1-ylo)-1,1,3,3-tetra-metylodi siloksanu		406–490–6	—	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
015–164–00–9	P, P'(1-hydroksyetyleno) bis(wodorofosfonian) wapnia - dihydrat		400–480–5	36669–85–9	R52–53	R: 52/53 S: 61		
015–165–00–4	mieszanina bis[heksafluorofosforanu(V)]tiobis(4,1-(fenyleno)-S, S, S', S'-tetrafenylo-disulfonium I heksafluorofosforanu(V)difenylu-(4-fenylotiofenylo)sulfonium		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-butylo-4-metylo-fenoksy)-2,4,8,10-tetraoksa-3,9-difosfa-spiro[5.5]undekan		410–290–4	80693–00–1	R53	R: 53 S: 61		
015–167–00–5	kwas 3-(hydroksyfenylofosfinylo)-propanowy		411–200–6	14657–64–8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
601–050–00–1	benzen, pochodne C_{10-13}- alkilów		267–051–0	67774–74–7	N; R50	N R: 50 S: 61		
601–051–00–7	4-fenylobut-1-en		405–980–7	768–56–9	Xi; R38 N; R51–53	Xi; N R: 38–51/53 S: (2-) 3 7-61		
602–083–00–4	pochodne pentabromowe eteru difenylowego; eter pentabromodifenylowy		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-dichloro-1-fluoroetan		404–080–1	1717–00–6	N; R52–53–59	N R: 52/53–59 S: 59-61		
603–128–00–0	2-(fenylometoksy)nafalen		405–490–3	613–62–7	R53	R: 53 S: 61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
603–129–00–6	l-tert-butoksypropan-2-ol		406–180–0	57018–52–7	R1O Xi; R41	Xi R: 10-41 S: (2-) 26-3 9		
603–130–00–1	mieszanina izomerów α-[(dimelylo)-bifenylo]-ω-hydroksypoli(oksyetylenu)		406–325–8	—	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-) 3 9-61		
603–131–00–7	mieszanina 1-dezoksy-1-[metylo(1-oksododecylo)amino)-D-glucitolu i 1-dezoksy-1-[metylo(1-oksotetradecylo)amino]-D-glucitolu (3:1)		407–290–1	—	Xi; R41	Xi R:41 S: (2-) 26-3 9		
603–132–00–2	2-hydroksymetylo-9-metylo-6-(1-metyloetylo)-1,4-dioksa-spiro[4.5]dekan		408–200–3	63187–91–7	Xi; R38–41 R52–53	Xi R: 38–41–52/53 S: (2-)26–37/39–61		
603–133–00–8	mieszanina 3-[(4-amino-2-chloro-5-nitrofenylo)amino)propano-1,2-diolu i 3,3-(2-chloro-5-nitro-1,4-fenyleno-diimino)bis (propano-1,2-diolu)		408–240–1	—	Xn; R22 R52–53	Xn R: 22–52/53 S: (2-)22–36–61		
603–134–00–3	mieszanina podstawionych dodecylem i/lub tetradecylem eterów difenylowych Produkt reakcji Friedela Craftsa. Katalizator jest usuwany z produktu. Eter difenylowy jest podstawiony grupami alkilowymi C1-C10. Grupy alkilowe są rozłożone losowo między węgle C1 iC6. Stosuje się grupy o prostym łańcuchu węglowym zawierające 12 i 14 atomów węgla w stosunku 50/50.		410–450–3	—	R53	R: 53 S: 61		
603–135–00–9	bis[2,2', 2"- nitrylotris (etanolano)]-1-N, Obis[2-(2-metoksyetoksy)etoksy)-tytan		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-hydroksyety lo)amino]-2-nitrofenylo amino)pfopan-1-ol		410–910–3	104226–19–9	R43 R52–53	Xi R: 43–52/53 S: (2-)24–37–61		
603–137–00-X	mieszanina 1-dezoksy-1-[metylo-1-oksoheksadecylo)amino] -D-glucitolu i 1-deoksy-1-(metylo-(1-oksooktadecylo)-amino]-D-glucitolu		411–130–6	—	Xi; R41	Xi R:41 S: (2-)26-39		
603–138–00–5	3-(2,2-dimetylo-3-hydroksypropylo)toluen; 2,2-dimetylo-3-(3-metyl ofenylo)propan-1-ol		403–140–4	103694–68–4	R52–53	R: 52/53 S: 61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
604–050–00-X	4-chloro-o-krezol 4-chloro-2-metylofenol		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;R-23–35 10 % ≤ C < 25 %:C; R20–35 5 % ≤ C < 10 %:C; R20–34 3 % ≤ C < 5 %:Xn; R20–36/37/38 1 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37/38	
604–051–00–5	3,5-bis(3,5-di-tert-butylo-4-hydroksy-benzylo) - 2,4,6-trimetylofenol		401–110–5	87113–78–8	R52–53	R: 52/53 S: 61		
604–052–00–0	2,2'-metylenobis[6-(2H- benzotriazol-2-ilo)-4-(1,1,3,3-tetrametylobutylo)fenol]		403–800–1	103597–45–1	R53	R: 53 S: 61		
604–053–00–6	2-metylo-4-tert-butylo-6-(1-metylo-pentadecylo)fenol;		410–760–9	157661–93–3	Xi; R38 R43 N; R50–53	Xi;N R: 38–43–50/53 S: (2-)24–37–60–61		
604–054–00–1	mieszanina 2-metoksy-4-(4-metylideno-tetrahydro-2H-piran-2-ylo)fenolu i 4-(4-metylo-3,6-dihydro-2H-piran-2-ylo)-2-metoksyfenolu		412–020–0	—	R43 R52–53	Xi R: 43–52/53 S: (2-)24–37–61		
604–055–00–7	2,2'-[(3,3', 5,5'-tetram etylo-1,1'-bifenylo-4,4'-diylo)bis(oksymetyleno)]bisoksiran		413–900–7	85954–11–6	Muta. Kat.3; R40	Xn R: 40 S: (2-)22–36–37		
605–027–00–7	mieszanina 3a, 4,5,6,7,7a-heksahydro-4,7-metano-1H-indeno-6-karboaldehydu i 3a, 4,5,6,7,7a-heksahydro-4,7-metano-1H-indeno-5-karboaldehydu		410–480–7	—	R43 N; R51–53	Xi;N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
606–051–00–0	4-pentylocykloheksanon		406–670–4	61203–83–6	N;R51–53	N R: 51/53 S: 61		
606–052–00–6	4-(N, N-dibutylamino)-2- hydroksy-2'-karboksybenzofenon		410–410–5	54574–82–2	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–272–00–5	fluroksypyr meptylowy (PN) [1]; 4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pirydyloksy)octan metyloheptylu [1]; fluroksypyrbutometylowy (PN)[2]; (4-amino-3,5-dichloro-6-fluoro-2-pyridyloksy)octan 2-butoksy-1-metyloetylu [2]		279–752–9 [1] —	81406–37–3 [1] 154486–27–8 [2]	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
607–273–00–0	7-[2,6-dimetylo-8-(2,2- dimetylobutyryl-oksy)-1,2,6,7,8,8a-heksahydro-1-naftylo]- 3,5-dihydrok syheptanian amonium		404–520–2	—	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–274–00–6	3-aminobut-2-enian 2-(N-benzylo-N-metyloamino)etylu		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	benzoiloksybenzeno-4-sulfonian sodu		405–450–5	66531–87–1	R43	Xi R:43 S: (2-)24-37		
607–276–00–7	bis[(1-metyloimidazolo)-(2-etyloheksaniano)]cynk		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	mieszanina chlorowodorku 2-(heksylosulfanylo) etyloaminy(2-(heksylotio)etyloaminy) i propionianu sodu		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	mieszanina izomerów fenetylonaftaleno-sulfonianu sodu i naftyloetylobenzeno-sulfonianu sodu		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	mieszanina bis(wodoromaleinianu)oktadecyloaminodietylu i wodoromaleinianu wodoroftalanu oktadecyloaminodietylu		405–960–8	—	R43 N; R51–53	Xi;N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–280–00–9	4-chloro-1-hydroksybutano-1-sulfonian sodu		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	mieszanina 3-[3-(2H -benzotriazol-2-ilo)-5-(1,1-dimetyloetylo)-4-hydroksyfenylo]-propanianów (C7–9)alkili(rozgałęzionych i nierozgałęzionych)		407–000–3	127519–17–9	N;R51–53	N R: 51/53 S: 61		
607–282–00-X	octan 2-acetoksymetylo-4-benz yloksybutylu		407–140–5	131266–10–9	R52–53	R: 52/53 S: 61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
607–283–00–5	(E)-4-okso-4-fenylobut-2-enian etylu		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	mieszanina 3,3'-[1,4-fenylenobis (karbonyloiminopropano–3,1-diyloimino)]bis-(10-amino-6,13-dichloro)trifenodioksazyno-4,11-disulfonianu) sodu i litu (9:1)		410–040–4	136213–76–8	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
607–285–00–6	mieszanina kwasu 7-[(3-aminofenylo) sulfonyloamino]naftaleno-1,3-disulfonowego; 7-[(3-aminofenylo)sulfonyloamino]naftaleno-1,3-disulfonianu sodu i 7-[(3-aminofenylo)sulfonyloamino]-naftaleno-1,3-disulfonianu potasu		410–065–0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–24–37		
607–286–00–1	mieszanina 7–3-[4-(2-hydroksynafty loazo)fenyloazo)fenylosulfonyloamino-naftaleno-1,3-disulfonianów sodu/potasu		410–070–8	141880–36–6	R43 R52–53	Xi R: 43–52/53 S: (2-)22–24–37–61		
607–287–00–7	1,2,3,6-tetrahydroftala n (1-metylo-2-metakryloksyetylu)-metylu		410–140–8	—	R52–53	R: 52/53 S: 61		
607–288–00–2	c-[3-(1–3-[e, 6-dichloro -5-cyjanopirymidyn-f-ylo(metylo)amino]propylo-2-hydroksy-4-metylo-6-okso-1,6-dihydro-3-pirydylazo)-4-sulfonianofenylosulfamoilo)ftalocyjanino-a, b, d-trisulfoniano(6-)]niklan(II) tetrasodu, gdzie: a = 1, 2, 3 lub 4; b =8, 9, 10 lub 11; c =15, 16, 17 lub 18; d =22, 23, 24 lub 25; e if są odpowiednio 2 i 4lub 4 i 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, l-dimetylopropylo)fen-oksy) butylaminokarbonylo-4-hydroksy– 1 -naftalenylo)tio) kwas propanowy		410–370–9	105488–33–3	R53	R: 53 S: 61		
607–290–00–3	mieszanina 1-(C14–18)alkiloksykarbonylo-2-(3-alliloksy-2-hydroksypropoksykarbonylo) etano-1-sulfonianu amonium i 2-(C14–18) alkiloksykarbonylo-1-(3-alliloksy-2-hydroksypropoksykarbonylo)etano-1-sulfonianu amonium (proporcja; nieznana)		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	ω-(C5/C6-cykloalkilo)alkanokarboksylan dodecylu		410–630–1	104051–92–5	R53	R: 53 S: 61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
607–292–00–4	mieszanina kwasu[1-(metoksymetylo)2-(C12-alkoksy)etoksy]octowego i kwasu [1-(metoksymetylo)-2-(C14-alkoksy)etoksy]octowego		410–640–6	—	Xi; R38–41 N; R50–53	Xi;N R: 38–41–50/53 S: (2-)26–37/39–60–61		
607–293–00-X	Mieszanina disulfonianu eteru mono-2,4,6-trimetylononylodifenylowego N-aminoetylopiperazonium i disulfonianu eterudi-2,4,6-trimetylononyl odifenylowego N-aminoetylopiperazonium		410–650–0	—	Xi; R41 R43 N;R51–53	Xi;N R: 4i_43_5i/53 S: (2-)26–36/37/39–61		
607–294–00–5	2-benzoiloksy-1-hydroksyetanosulfonian sodu		410–680–4	—	R43	Xi R:43 S: (2-)24-37		
607–295–00–0	mieszanina fosfonoetano-1,2-dikarboksylanu tetrasodu i fosfonobutano-1,2,3,4-tetrakarboksylanu heksasodu		410–800–5	—	R43 N; R51–53	Xi;N R: 43–51/53 S: (2-)24–37–61		
607–296–00–6	mieszanina tetraestrów pentaerytrytolu z kwasem heptanowym i kwasem 2-etyloheksanowym		410–830–9	—	R53	R: 53 S: 61		
607–297–00–1	(E, E)- 3,3'-(1,4-fenylenodimetylideno)-bis (kwas 2-oksobornano-10-sulfonowy)		410–960–6	92761–26–7	Xi; R41	Xi R:41 S: (2-)26-39		
607–298–00–7	2-(trimetyloamonium)etoksykarboksybenzeno-4-sulfonian		411–010–3	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22–36/37		
607–299–00–2	3-(acetylosulfanylo)-2- metylopropanian metylu;		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	[2-(5-chloro-2,6-difluoropirymidyn-4-ylo-amino)-5-(b-sulfamoilo-c, d-sulfonianoftalocjanin-a-ylo-K4, N29, N30, N31, N32-sulfonyloamino)benzoesano(5-)]-miedzian(II)trisodu, gdzie 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	mieszanina kwasu dodekanowego i poli(1-7) mleczanowych estrów kwasu dodekanowego		411–860–5	—	Xi; R 38-41 R43 N;R51–53	Xi;N R: 38–41–43–51/53 S: (2-)24–26–37/39–61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
607–302–00–7	mieszanina kwasu tetradekanowego i poli(1-7) mleczanowych estrów kwasu tetradekanowego		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	kwas 1-cyklopropylo-6,7-difl uoro-4-okso-1,4-dihydrochinolino-3-karboksylowy		413–760–7	93107–30–3	Repr. Kat.3; R62 R52–53	Xn R: 62–52/53 S: (2-)22–36/37–61		
608–023–00–3	4-(4-chlorofenylo)-2-fe nylo-2-[(1H-1,2,4-triazol-1-ilo)metylo]-butanonitryl		406–140–2	114369–43–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
608–024–00–9	2-[4-(N-butylo-N-fenetyloamino)fenylo]-etyleno-1,1,2-trikarbonitryl		407–650–8	97460–76–9	R53	R: 53 S: 61		
608–025–00–4	2-nitro-4,5-bis(benzyloksy)fenylo-acetonitryl		410–970–0	117568–27–1	R53	R: 53 S: 61		
609–053–00-X	hydrazynotrinitrometan		414–850–9	—	E; R3 O;R8 Rakotw. Kat. 2; R45 T; R23/25 R43	E;T R: 45–3–8–23/25–43 S: 53-45		
610–010–00–2	2-bromo-1-(2-furylo)-2- nitroeten, 2-bromo-1-(2-furylo)- 2 -nitroetylen R34 22–34–43–48/22–50/5		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	mieszanina (2:1:1): N(1')-N(2):N(1')-N(2)-h-6-[2-amino-4-(lub6)-hydroksy(lub4-amino-2-hydroksy)fenyloazo]- 6- (1-karboniloilo-2-hydroksyprop-1-enyloazo)- 5', 5-disulfamoilo-3,3-disulfonianobis(naftaleno-2,1'-azobenzeno-1,2'-diolano-O(1), O(2)-chromianu trisodu, N(1')-N(2):N(1')-N(2)-h-6,6'- bis(1-karboniloilo-2-hydroksyprop-1-enyloazo)- 5', 5"-disulfamoilo-3,3 - disulfonianobis (naftaleno-2,1'-azobenzeno-1,2'-diolano-O(1), O(2')-chromianu trisodu oraz N(1)-N(2):N(1)-N(2')-h-6,6 - bis-[2-amino-4-(lub 6)-hydroksy-(lub 4-amino-2-hydroksy)fenyloazo]-5', 5-disulfamoilo-3,3'- disulfonianobis(naftaleno-2,1'-azobenzeno-1,2'-diolano-O(1), O(2)-chromianu trisodu		402–850–1		Xi; R41 52-53	Xi R: 41–52/53 S: (2-)26–39–61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
611–044–00–0	mieszanina soli tert-alkilo(C12–14)-amoniowych:bis1-[(2-hydroksy-5-nitrofenylo)azo]- 2-naftalenolano(2-)-chromianu(1-), bis1-[(2-hydroksy-4-nitrofenylo)azo]-2-naftalenolano(2-)]-chromianu(1-), bis[1-[5-(1,1-dimetylopropylo)-2-hydroksy-3-nitrofenylo]azo-2-naftalenolano(2-)]-chromianu(1-), (1-[(2-hydroksy-3-nitrofenylo)azo]-2-naftalenolano(2-) -1-[(2-hydroksy-5-nitrofenylo)azo]-2-naftalenolano(2-)]-chromianu(1-), [1-[5-(1,1-dimetylopropylo)-2-hydroksy-3-nitrofenylo]azo-2-naftalenolano(2-)]-chromianu(1-), 1-[4(lub5)-nitro-2-oksydofenyloazo]-2-naftolano[1-(3-nitro-2-oksydo-5-pentylofenyloazo)-2-naftolano]-chromianu(1-)		403–720–7	117527–94–3	N; R51–53	N R: 51/53 S: 61		
611–045–00–6	2-4-[N-(4-acetoksybutylo)-N-etylo]-amino-2-metylofenyloazo-3-acetylo-5-nitrotiofen		404–830–8	—	R53	R: 53 S: 61		
611–046–00–1	4,4'-diamino-2-metyloazobenzen		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	mieszanina 2-(4-[N-etylo-N-(2-acetoksyetylo)amino] fenyloazo)- 5,6-dichlorobenzotiazolu i 2-(4-[N-etylo-N-(2-acetoksyetylo)amino]fenyloazo)- 6,7-dichlorobenzotiazolu (1:1)		407–890–3	111381–11–4	R53	R: 53 S: 61		
611–048–00–2	mieszanina 2-(4-[bis(2-acetoksyetylo)-amino]fenyloazo)- 5,6-dichlorobenzotiazolu i 2-(4-[bis(2-acetoksyetylo)amino]-fenyloazo)-6,7-dichlorobenzotiazolu (1:1)		407–900–6	111381–12–5	R53	R: 53 S: 61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
611–049–00–8	mieszanina 7-[4-(3-dietyloaminopropyloamino) -6-(3-dietyloamoniopropyloamino)- 1,3,5-triazyn-2-yloamino]-4-hydroksy-3-(4-fenyloazofenyloazo)-naftaleno-2-sulfonianu, kwasuoctowego i kwasu mlekowego (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	chlorek 2–4-[N-etylo-N-(2-hydroksy-etylo)amino]-2-metylofenyloazo-6-metoksy-3 -metylobenzotiazolium		411–110–7	136213–74–6	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
611–052–00–4	akwa-[5-(2,4-dihydroksy -5-[(2-hydroksy-3,5-dinitrofenylo)azo] fenyloazo)-naftaleno-2-sulfonian] monosodu, kompleks z żelazem		400–720–9	—	R52–53	R: 52/53 S: 61		
612–156–00–2	mieszanina chlorku triheksadecylometyloamonium i chlorku diheksadecylodimetyloamonium		405–620–9	—	Xi; R41 N; R50–53	Xi; N R: 41–50/53 S: (2-)26–39–60–61		
612–157–00–8	chlorowodorek oksymu(Z)-1-benzo[b]-2-tienyloetanonu		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	mieszanina bis[oksymianu(5-dodecylo-2-hydroksybenzaldehydu)]miedzi(II)(C12-alkil jestrozgałęziony) i oksymu4-dodecylosalicyloaldehydu (oksymu(4-dodecylo-2-hydroksyfenylo) -formaldehydu)		410–820–4	—	R53	R: 53 S: 61		
612–159–00–9	produkty reakcji trimetyloheksametylenodiaminy (mieszaniny 2,2,4-trimetyloheksano-1,6-diaminy i 2,4,4-trimetylo-heksano-1,6-diaminy) z Epoksydem 8(pochodnymi mono [(C10–16alkiloksy)-metylo]oksiranu) i z kwasem p-toluenosulfonowym		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-butylo-5-(4-tert -butylobenzylotio)-4-chloropirydazyn-3(2H)-on		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'-(piperazyno– 1,4-diylo)dipropylo]bis (1H-benzoimidazo[2,1-b]benzo[l, m, n][3,8]fenantrolino-1,3,6-trion)		406–295–6	—	R53	R: 53 S: 61		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
613–151–00–8	1-(3-mesyloksy-5-trytyloksymetylo-2-D-treo-furylo)tymina;1-(3-metylosulfonyloksy-5-trytyloksymetylo-2-D-treo-furylo)tymina		406–360–9	104218–44–2	R53	R: 53 S: 61		
613–152–00–3	N-(4,6-dimetoksypirymidyn-2-ylo)karbaminian fenylu		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-trichloropirydyna		407–270–2	16063–70–0	R52–53	R: 52/53 S: 61		
613–154–00–4	2-amino-4-chloro-6-metoksypirymidyna		410–050–9	5734–64–5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
613–155–00-X	5-chloro-2,3-difluoro piydyna		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-butylo-4-chloro-5-formyloimidazol		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-metoksymetylopirymidyna		410–330–0	54236–98–5	Xn; R22–48/22 Xi; R36	Xn R: 22–36–48/22 S: (2-)22–26–36		
613–158–00–6	2,3-dichloro-5-trifluorometylopirydyna		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-dimetyloety lo)fenylo]etoksychinazolina		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	dibromowodorek (1S)-2-metylo-2,5-diazo bicyklo[2.2.1]heptanu		411–000–9	125224–62–6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
615–022–00–1	3-(izocyjanianosulfonylo) tiofeno-2-karboksylan metylu		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		

Nr indeksu	Nazwa chemiczna	Uwagi odnoszące się do substancji	Nr WE	Nr CAS	Klasyfikacja	Etykietowanie	Ograniczenia stężenia	Uwagi odnoszące się do preparatów
615–023–00–7	2-(izocyjanianosulfonylometylo)benzoesan metylu; ester metylowy kwasu2-(izocyjanianosulfonylometylo)benzoesowego R20–48/22 S:		410–900–9	83056–32–0	R10 R14 Muta. Kat. 3; R40 Xn; R20–48/22 Xi; R41 R42	Xn R: 10— 14–20–40–41–42–48/22 S: (2-)23–26–36/37/39		
616–044–00–4	N-(3,5-dichloro-4-etylo -2-hydroksy-fenylo)-2-(3-pentadecylofenoksy)-b utanoamid		402–510–2	—	N;R51–53	N R: 51/53 S: 61		
616–045–00-X	2'-(4-chloro-3-cyjano - formylo-2-tienyloazo)-5'-dietyloamino-2-metoksyacetanilid		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-chloro-7-metylo pirazolo-(1,5-b][1,2,4) triazol-4-ilo)propylo]-2-(2,4-di-tert-pentylofenoksy)-oktanoamid		406–390–2	—	N; R50–53	N R: 50/53 S: 60-61		
616–047–00–0	mieszanina 2,2', 2", 2'"- etylenodini trilo-tetrakis-N, N-di(C16)alkiloacetamidu i 2,2', 2", 2'"- etylenodinitrilotetrakis-N, N-di(C18) alkiloacetamidu		406–640–0	—	R43	Xi R:43 S: (2-)24-37		
616–048–00–6	3'-trifluorometyloizobu tyranilid		406–740–4	1939–27–1	Xn; R48/22 N; R51–53	Xn;N R: 48/22–51/53 S: (2-)22–36–61		
616–049–00–1	2-[2,4-bis(1,1-dimetyloetylo)fenoksy)-N-(3,5-dichloro-4-etylo-2-hydroksyfenylo)-heksanoamid		408–150–2	99141–89–6	R53	R: 53 S: 61		
616–050–00–7	N-[2,5-dichloro-4-(1,1, 2,3,3,3-heksa-fluoro-propoksy)fenyloaminokarbonylo]- 2,6-difluo-robenzamid		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	mieszanina 2,4 -bis[N'-(4-metylofenylo)-ureido]toluenu i 2,6-bis[N'-(4-metylo-fenylo)ureido]toluenu		411–070–0	—	R53	R: 53 S: 61		
617–015–00–9	nadtlenek bis(4-metylobenzoilowy)		407–950–9	895–85–2	E; R2 O; R7 N; R50–53	E;N R: 2–7–50/53 S: (2-)7–14–36/37/39–47–60–61		
650–032–00-X	cyprokonazol (PN); (2RS, 3RS)-i(2RS, 3SR)-2-(4-chlorofenylo)-3-cyklopropylo-1-(1H-1,2,4-triazol-1-ilo)butan-2-ol		—	94361–06–5	Repr. Kat. 3; R63 Xn; R22 N; R50–53	Xn;N R: 22–50/53–63 S: (2-) 3 6/3 7–60–61		

ZAŁĄCZNIK 2

Zob.: Dyrektywa Komisji 2001/59/WE z 21.8.2001, str. 1.

ZAŁĄCZNIK 3A

Zob.: Dyrektywa Komisji 2001/59/WE z 21.8.2001, str. 1.

ZAŁĄCZNIK 3B

Zob.: Dyrektywa Komisji 2001/59/WE z 21.8.2001, str. 1.

ZAŁĄCZNIK 4A

„B.10. MUTAGENNOŚĆ — BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ SSAKÓW *IN VITRO*

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 473, metody badania aberracji chromosomowej ssaków *in vitro* (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Celem badania chromosomowej aberracji u ssaków jest zidentyfikowanie czynników, które powodują strukturalne chromosomowe aberracje w hodowanych komórkach ssaków. (1) (2) (3). Strukturalne aberracje mogą występować w dwóch typach, chromosomowym lub chromatydowym. W przypadku mutagenów chemicznych większość wywołanych aberracji jest typu chromatydowego, ale mogą się pojawiać aberracje typu chromosomowego. Wzrost poliploidalności może wskazywać, że substancja chemiczna ma potencjał do wywoływania aberracji liczbowej. Jednakże metoda ta nie jest wykorzystywana do pomiarów aberracji liczbowych i nie jest rutynowo wykorzystywana do tego celu. Mutacje chromosomowe oraz powiązane z nimi zdarzenia są przyczyną wielu chorób genetycznych u ludzi oraz istnieje dowód na to, że mutacje chromosomowe oraz związane z nimi zdarzenia powodujące zmiany w onkogenach oraz genach hamowania nowotworów komórek somatycznych są odpowiedzialne za wywoływanie raka u ludzi oraz zwierząt doświadczalnych.

Aberracja chromosomowa *in vitro* może wykorzystywać ustanowione linie komórkowe, łańcuchy komórkowe lub pierwotne hodowle komórek. Wykorzystane komórki są wybierane na podstawie możliwości wzrostu hodowli, stabilności kariotypu, liczby chromosomów, zróżnicowania chromosomów oraz spontanicznych częstotliwości aberracji.

Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają wykorzystania źródła egzogennego aktywacji metabolicznej. Ten system aktywacji metabolicznej nie może imitować w całości warunków *in vivo* w odniesieniu do ssaków. Powinna zostać zachowana ostrożność w celu uniknięcia warunków, które mogłyby prowadzić do pozytywnych wyników, które nie odzwierciedlają wewnętrznej mutagenności oraz mogą wynikać ze zmian w pH, stężeniu osmolalnym lub wysokich poziomów cytotoksyczności (4) (5).

Badanie to jest wykorzystywane w celu sprawdzenia możliwych czynników mutagennych oraz rakotwórczych dla ssaków. Wiele związków, które mają charakter dodatni w tym badaniu, są czynnikami rakotwórczymi dla ssaków, jednakże nie istnieje idealne powiązanie między tym badaniem a rakotwórczością. Powiązanie zależne jest od klasy chemicznej oraz jest coraz więcej dowodów na to, że istnieją czynniki rakotwórcze, które nie są wykrywane w drodze tego badania, ponieważ wydaje się, iż działają one poprzez mechanizmy inne niż bezpośrednie niszczenie DNA.

Patrz również: Ogólne wprowadzenie do części B.

1.2. DEFINICJE

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu, wyrażone jako pękanie pojedynczych chromatydów lub pękanie oraz ponowne łączenie między chromatydami.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu, wyrażone jako pękanie pojedynczych chromatydów lub pękanie oraz ponowne łączenie obu chromatydów w identycznej lokalizacji.

Endoreduplikacja: proces, w którym po okresie replikacji DNA jądro nie ulega mitozie, ale rozpoczyna nowy okres S. Wynikiem są chromosomy o 4, 8, 16,… chromatydach.

Szczelina: achromatyczne uszkodzenie mniejsze niż szerokość chromatydu, powodujące minimalne wypaczenie chromatydu.

Indeks mitotyczny: stosunek komórek w metafazie podzielony przez całkowitą liczba komórek zaobserwowany w populacji komórek; wskazanie stopnia proliferacji tej populacji.

Aberracja liczbowa: zmiana w ilości chromosomów w odniesieniu do normalnej ilości charakterystycznej dla wykorzystywanych komórek.

Poliploidalność: wielokrotność ilości chromosomów haploidalnych (n) inna niż liczba diploidalna (np. 3 *n*, 4 *n* itd.).

Aberracja strukturalna: zmiana w strukturze chromosomu, wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy podziału komórek, zaobserwowana jako usunięcia oraz fragmenty, zmiany (zachodzące — wewnątrz oraz między chromosomami)

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Hodowle komórek są poddane działaniu substancji badanej zarówno z aktywacją, jak i bez aktywacji metabolicznej. Substancje są poddawane działaniu metafazy zatrzymującej (np. Colcemid® lub kolchicyna) substancje we wcześniej określonych odstępach czasu po poddaniu hodowli komórek działaniu substancji badanej, komórki pobrane, zabarwione oraz komórki metafazy są analizowane mikroskopowo na obecność aberracji chromosomowych.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Preparaty**

1.4.1.1. *Komórki*

Wykorzystywane mogą być rozmaite linie komórkowe, łańcuchy lub pierwotne hodowle komórek łącznie z komórkami ludzkimi (np. fibroblasty chomika chińskiego, limfocyty krwi obwodowej ludzi lub ssaków).

1.4.1.2. *Warunki dotyczące podłoża hodowli i hodowli*

W utrzymywaniu hodowli powinny być stosowane odpowiednie warunki podłoża hodowli oraz inkubacji (naczynia do hodowli, stężenie CO_2, temperatura oraz wilgotność). Ustanowione linie komórkowe oraz szczepy powinny być rutynowo sprawdzane pod kątem stabilności zmiennej ilości chromosomów oraz nieobecności zanieczyszczenia mykoplazmą oraz nie powinny być wykorzystywane, jeżeli są zanieczyszczone. Normalny czas cyklów komórkowych oraz wykorzystywane warunki dotyczące hodowli powinny być znane.

1.4.1.3. *Preparaty hodowli*

Ustanowione linie komórkowe oraz łańcuchy: komórki są rozmnażane z hodowli podstawowej, siane na podłożu hodowli w takiej gęstości, że hodowle nie osiągną zrastania się przed czasem pobierania oraz są inkubowane w temperaturze 37 °C.

Limfocyty: krew pełna jest poddawana działaniu antykoagulantu (np. heparyny) lub oddzielone limfocyty uzyskane ze zdrowych przedmiotów są dodawane do podłoża hodowli zawierającego mitogen (np. phytohaemagglutinin) oraz inkubowane w temperaturze 37 °C.

1.4.1.4. *Aktywacja metaboliczna*

Komórki powinny zostać poddane działaniu substancji badanej zarówno w obecności, jak i w nieobecności odpowiedniego systemu aktywacji metabolicznej. Najpowszechniej wykorzystywanym systemem jest frakcja przesączu znad mitochondriów uzupełniona o kofaktor, przygotowana z wątroby gryzoni poddanej działaniu substancji, czynnikami pobudzającymi enzymy, takimi jak Aroklor 1254 (6) (7) (8) (9) lub mieszanina fanobarbitonu oraz β-naftoflawonu (10) (11) (12).

Frakcja przesączu znad mitochondriów jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie 1-10 % objętościowo w końcowym nośniku badania. Warunki systemu aktywacji metabolicznej mogą być uzależnione od klasy badanej substancji chemicznej. W niektórych przypadkach właściwe może być wykorzystanie więcej niż jednego stężenia frakcji przesączu znad mitochondriów.

Pewna liczba ulepszeń, w tym konstrukcja genetycznie modyfikowanych linii komórkowych wyrażających szczególne enzymy aktywujące, mogą zapewnić możliwość aktywacji endogenicznej. Wybór wykorzystanych linii komórkowych powinien być uzasadniony naukowo (np. przez znaczenie izoenzymu cytochromowego P450 dla metabolizmu substancji).

1.4.1.5. *Substancja badana/przygotowanie*

Stała substancja badana powinna zostać rozpuszczona lub zawieszona w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczona, jeżeli jest to odpowiednie, przed poddaniem jej działaniu komórek. Płynne substancje badane mogą być dodawane bezpośrednio do systemu badawczego i/lub rozcieńczane przed poddaniem ich działaniu komórek. Powinny zostać wykorzystane świeżo przygotowywane substancje, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

1.4.2. **Warunki badania**

1.4.2.1. *Rozpuszczalnik/nośnik*

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien mieć możliwości reagowania chemicznego z substancją badaną oraz powinien być zgodny z przeżywaniem komórek oraz aktywnością S9. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do badania powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Badając substancje nietrwałe w wodzie, wykorzystane rozpuszczalniki organiczne powinny być wolne od wody. Woda może zostać usunięta przez zastosowanie sita molekularnego.

1.4.2.2. *Stężenia poddania działaniu substancji*

Wśród kryteriów, które mają zostać uwzględnione przy określaniu najwyższego stężenia, znajduje się cytotoksyczność, rozpuszczalność w systemie oraz zmiany pH lub osmolalność.

Cytotoksyczność powinna zostać określona z aktywacją lub bez aktywacji metabolicznej w ramach głównego doświadczenia, przy wykorzystaniu odpowiedniego wskazania dotyczącego integralności komórki oraz wzrostu, takiego, jak stopień zrastania się, liczba komórek zdolnych do życia lub indeksy mitotyczne. Może to być użyteczne do oznaczenia cytotoksyczności oraz rozpuszczalności w doświadczeniu wstępnym.

Powinny zostać wykorzystane co najmniej trzy nadające się do analizy stężenia. W przypadku gdy pojawia się cytotoksyczność, stężenia te powinny obejmować zakres od najwyższej do małej toksyczności lub jej braku; będzie to zazwyczaj oznaczać, że stężenia powinny zostać rozdzielone przez nie więcej niż jeden czynnik między 2 a $\sqrt{10}$. W czasie pobierania wyhodowanych komórek najwyższe stężenia powinny wskazywać znaczące zmniejszenie w stopniu zrastania się, liczbie komórek lub indeksie mitotycznym (wszystkie wyższe niż 50 %). Indeks mitotyczny jest jedynie bezpośrednią miarą skutków cytotoksycznych/cytostatycznych oraz jest zależny od czasu po poddaniu działaniu substancji. Jednakże indeks mitotyczny jest dopuszczalny w odniesieniu do hodowli zawiesinowych, w których inne pomiary toksyczności mogą być niewygodne i niepraktyczne. Informacje w sprawie kinetyki komórek, takie jak średnie czasy tworzenia się (AGT), mogą być wykorzystywane jako informacje dodatkowe. Jednakże AGT jest ogólną średnią, która nie zawsze ujawnia istnienie opóźnionych podpopulacji, a nawet delikatne wzrosty średnich czasów tworzenia się mogą być związane z bardzo zasadniczym opóźnieniem w czasie optymalnych wydajności aberracji.

W odniesieniu do substancji względnie niecytotoksycznych, maksymalne stężenie badawcze powinno wykosić 5µl/ml, 5 mg/ml lub 0,01 M, w zależności od tego, które z nich jest najniższe.

W odniesieniu do substancji względnie nierozpuszczalnych, które nie są toksyczne w stężeniach niższych niż stężenia nierozpuszczalne, najwyższa wykorzystana dawka powinna być stężeniem powyżej limitu rozpuszczalności w końcowym podłożu hodowli na koniec okresu poddawania działaniu substancji. W niektórych przypadkach (np. kiedy toksyczność pojawia się wyłącznie przy wyższym, niż najniższe stężeniu nierozpuszczalnym) słuszne jest przeprowadzenie badania na jednym większym stężeniu z widocznym strącaniem się. Użyteczna może być ocena rozpuszczalności na początku oraz na końcu poddawania działaniu substancji, ze względu na to, że rozpuszczalność może zmieniać się w trakcie trwania poddania działaniu substancji w systemie badawczym spowodowana obecnością komórek, surowicy S9 itp. Nierozpuszczalność może zostać wykryta okiem nieuzbrojonym. Stężanie nie powinno zakłócać oceny.

1.4.2.3. *Kontrole pozytywne i negatywne*

Równoległe kontrole pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik lub nośnik), zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej, powinny zostać objęte każdym doświadczeniem. Kiedy wykorzystywana jest aktywacja metaboliczna, pozytywna kontrolna substancja chemiczna jest substancją, która wymaga aktywacji w celu wywołania reakcji mutagennej.

Pozytywne kontrole powinny wykorzystywać znany elastogen przy poziomie poddania działaniu substancji, od którego oczekuje się wytworzenia odtwarzalnego oraz wykrywalnego wzrostu poza tło, które wskazuje czułość systemu.

Stężenia pozytywnych kontroli powinny zostać wybrane tak, aby były jasne, ale by badającemu nie ujawniały bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek laboratoryjnych. Przykłady pozytywnych substancji kontrolnych obejmują:

Warunki aktywacji metabolicznej	Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
Nieobecność egzogenicznej aktywacji metabolicznej	metanosulfonat metylu	66–27–3	200–625–0
	metanosulfonat etylu	62–50–0	200–536–7
	nitrozomocznik etylu	759–73–9	212–072–2
	mitomycyna C	50–07–7	200–008–6
	N-tlenek-4-nitrokwinolinu	56–57–5	200–281–1
Obecność egzogenicznej aktywacji metabolicznej	benzo[a]piren	50–32–8	200–028–5
	cyklofosfamid	50–18–0	200–015–4
	cyklofosfamid monohydrat	6055–19–2	

Mogą być wykorzystane inne właściwe substancje kontroli pozytywnych. Wykorzystanie substancji chemicznej z klasy powiązanej z kontrolą pozytywną powinno zostać rozważone, jeżeli jest dostępne.

Kontrole negatywne składające się z rozpuszczalników lub samego nośnika w podłożu poddania działaniu substancji, oraz poddanie działaniu substancji w ten sam sposób, co hodowle poddane działaniu substancji, powinny zostać włączone w ramy każdego okresu pobierania hodowli. Dodatkowo wykorzystywane powinny być kontrole, w ramach których nie poddaje się działaniu substancji, chyba że istnieją dane historyczne dotyczące kontroli wskazujące na to, że inne skutki szkodliwe lub mutagenne są wywołane wybranym rozpuszczalnikiem.

1.4.3. **Procedura**

1.4.3.1. *Poddanie działaniu substancji badanej*

Komórki rozmnażające się wegetatywnie są poddawane działaniu wykorzystując substancję badaną w obecności oraz nieobecności systemu aktywacji metabolicznej. Przetwarzanie limfocytów powinno następować w około 48 godzin po stymulacji mitogenicznej.

1.4.3.2. Hodowle reprodukcyjne powinny normalnie być wykorzystywane przy każdym stężeniu, oraz są one silnie zalecane w odniesieniu do negatywnych/rozpuszczalnikowych hodowli kontrolnych. W przypadku gdy na podstawie danych historycznych mogą zostać przedstawione minimalne zmiany między hodowlami reprodukcyjnymi (13) (14), dopuszczalne może być, aby pojedyncze hodowle miały być wykorzystywane przy każdym badaniu.

Substancje gazowe lub lotne powinny być badane odpowiednia metodą, taką jak badanie w szczelnie zamkniętych naczyniach do hodowli (15) (16).

1.4.3.3. *Czas pobierania hodowli*

W pierwszym doświadczeniu komórka powinna być poddana działaniu substancji badanej, zarówno z aktywacja metaboliczną, jak i bez niej, przez 3-6 godzin, oraz próbki powinny zostać pobrane w czasie równoważnym długości około 1,5 cyklu komórkowego po rozpoczęciu poddawania działaniu substancji (12). Jeżeli ten protokół daje negatywne wyniki, zarówno z aktywacją, jak i bez niej, powinno zostać przeprowadzone dodatkowe doświadczenie, z ciągłym poddawaniem działaniu substancji badanej do momentu pobrania próbek w czasie równoważnym długości 1,5 cyklu komórkowego. Niektóre substancje chemiczne mogą być wykryte z mniejszym trudem przez czasy poddawania działaniu substancji badanej/pobierania próbek dłuższe niż długości 1,5 cyklu. Wyniki negatywne z metaboliczną aktywacją muszą zostać ustalone na zasadzie jednostkowych przypadków. W tych przypadkach, gdy potwierdzenie negatywnych wyników nie jest uznawane za niezbędne, powinno zostać zapewnione uzasadnienie.

1.4.3.4. *Preparaty chromosomów*

Hodowle komórek są poddawane działaniu Colcemidu® lub kolchicyny zazwyczaj przez 1-3 godzin przed pobraniem hodowli. Każda hodowla komórek jest pobierana oraz poddawana działaniu substancji oddzielnie w celu przygotowania chromosomów. Przygotowanie chromosomów obejmuje hipotoniczne przetwarzanie komórek, wiązanie oraz barwienie.

1.4.3.5. *Analiza*

Wszystkie szkiełka mikroskopowe, włącznie z tymi dotyczącymi pozytywnych oraz negatywnych kontroli powinny zostać odpowiednio zakodowane przed analizą mikroskopową. Ze względu na to, że procedury wiązania, utrwalania barwnika często skutkują przerwaniem stosunku komórek metafazy do straty chromosomów, oceniane komórki powinny z tego względu zawierać liczbę centromerów równą zmiennej liczbie ≠ 2 dla wszystkich rodzajów komórek. Powinno zostać ocenione przynajmniej 200 dobrze rozciągniętych metafaz na stężenie oraz kontrole, równo podzielonych między wtórniki, jeżeli ma to zastosowanie. Liczba ta może zostać zredukowana, jeśli zaobserwowana jest wysoka liczba aberracji.

Chociaż celem badania jest wykrycie strukturalnych aberracji chromosomowych, ważne jest odnotowanie poliploidalności oraz endoreduplikacji, jeśli zaobserwowane są te zdarzenia.

2. DANE

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Jednostką doświadczalną jest komórka, a z tego względu udział procentowy komórek ze strukturalną aberracją chromosomową powinien zostać poddany ocenie. Różne typy strukturalnej aberracji chromosomowej powinny zostać wymienione wraz z ich ilościami oraz częstotliwościami w odniesieniu do hodowli doświadczalnych oraz kontrolnych. Szczeliny są oddzielnie odnotowywane oraz zgłaszane, ale ogólnie nie są włączane do częstotliwości aberracji ogółem.

Równoległe pomiary cytotoksyczności w odniesieniu do wszystkich przetwarzanych oraz negatywnych hodowli kontrolnych w ramach głównych doświadczeń aberracji, powinny również zostać odnotowane.

Powinny zostać dostarczone dane dotyczące poszczególnych hodowli. Dodatkowo wszelkie dane powinny zostać podsumowane w formie tabelarycznej.

Nie istnieje wymóg jasnej reakcji pozytywnej w odniesieniu do weryfikacji. Niejednoznaczne wyniki powinny zostać wyjaśnione w drodze dalszych badań, w szczególności z wykorzystaniem modyfikacji warunków doświadczalnych. Potrzeba potwierdzenia wyników negatywnych została omówiona w ppkt. 1.4.3.3. Modyfikacje parametrów badawczych w celu poszerzenia zakresu ocenionych warunków powinna zostać rozważona w dalszych doświadczeniach. Parametry badawcze, które mogą być zmodyfikowane obejmują zakres stężenia oraz warunki aktywacji metabolicznej.

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany ze stężeniem wzrost odtwarzalności w pewnej ilości komórek z aberracjami chromosomowymi. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Metody statystyczne mogą zostać wykorzystane jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (3) (13). Znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej.

Wzrost ilości komórek poliploidalnych może wskazywać, że substancja badana ma potencjał do wstrzymywania procesów mitotycznych oraz pobudzania liczbowych aberracji chromosomowych. Wzrost liczby komórek z endoreduplikowanymi chromosomami może wskazywać, że substancje badane mają potencjał wstrzymywania postępowania cyklu komórkowego (17) (18).

Substancja badana, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów uważana jest za niemutagenną w tym systemie.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawało w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie uniemożliwiał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności substancji badanej. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne, niezależnie od tego, ile razy doświadczenia były powtarzane.

Wyniki pozytywne z badania chromosomowej aberracji *in vitro* wskazują, że substancja badana wywołuje aberracje. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych, substancja badana nie wywołuje aberracji chromosomowej hodowanych komórek somatycznych ssaków.

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli jest znana.

Komórki:

— rodzaj i źródło komórek,

— cechy kariotyczne oraz odpowiedniość wykorzystanych komórek,

— nieobecność mykoplazmy, jeżeli ma zastosowanie,

— informacja w sprawie długości cyklu komórkowego,

— płeć dawcy krwi, krew całkowita lub oddzielone limfocyty, wykorzystany mitogen,

— liczba przejść, jeżeli ma zastosowanie,

— metoda utrzymania hodowli komórek, jeżeli ma zastosowanie,

— zmienna liczba chromosomów.

Warunki badania:

— tożsamość metafazy zatrzymującej substancję, jej stężenie oraz czas trwania poddania działania substancji,

— racjonalne uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby hodowli, w tym np. dane dotyczące cytotoksyczności oraz ograniczeń rozpuszczalności, jeżeli są dostępne,

— skład podłoża, stężenie CO_2, jeżeli ma zastosowanie,

— stężenie substancji badanej,

— objętość nośnika oraz dodanej substancji badanej,

— temperatura inkubacji,

— czas inkubacji,

— czas trwania poddania działaniu substancji,

— gęstość komórki w czasie osadzania, jeżeli właściwe,

— typ oraz skład systemu aktywacji metabolicznej włącznie z kryteriami dopuszczalności,

— kontrole pozytywne i negatywne,

— metody przygotowania szkiełek mikroskopowych,

— kryteria w odniesieniu do oceniającej aberracji,

— liczba przeanalizowanych metafaz,

— metody pomiarów toksyczności,

— kryteria uznawania badań za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne,

Wyniki:

— oznaki toksyczności, np. stopień zrastania się strumieni, dane dotyczące cyklu komórkowego, obliczenia liczby komórek, indeks mitotyczny,

— oznaki strącania,

— dane dotyczące pH oraz osmolalności podłoża poddania działaniu substancji, jeżeli są określone,

— definicje aberracji, w tym szczelin,

— liczba komórek z aberracjami chromosomowymi oraz typ aberracji chromosomowej podane osobno w odniesieniu do każdej poddanej działaniu substancji badanej oraz kontrolnej hodowli,

— zmiany poliploidalności, jeżeli są znane,

— relacja miedzy dawką a reakcją, w miarę możliwości,

— analizy statystyczne, jeżeli istnieją,

— dane dotyczące równoległych negatywnych (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywnych kontroli,

— historyczne dane dotyczące negatywnych (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywnych kontroli, ze średnimi oraz standardowymi odchyleniami.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **ODNIESIENIA**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, w: *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, w: *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."

ZAŁĄCZNIK 4B

„B.11. MUTAGENNOŚĆ — BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ SZPIKU KOSTNEGO *IN VIVO*

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 475, Metody Badania Aberracji Chromosomowej Szpiku Kostnego (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Badanie aberracji chromosomowej ssaków *in vivo* jest wykorzystywane w celu wykrycia strukturalnych aberracji chromosomowych komórek szpiku kostnego zwierząt, zwykle gryzoni, wywołanych przez substancje badane (1) (2) (3) (4). Strukturalne aberracje mogą występować w dwóch typach, chromosomowym lub chromatydowym. Wzrost poliploidalności może wskazywać, że substancja chemiczna ma potencjał do wywoływania aberracji liczbowej. W przypadku mutagenów chemicznych większość wywołanych aberracji jest typu chromatydowego, ale mogą pojawiać się również aberracje typu chromosomowego. Mutacje chromosomowe oraz powiązane z nimi zdarzenia są przyczyną wielu ludzkich chorób genetycznych oraz istnieje dowód na to, że mutacje chromosomowe oraz związane z nimi zdarzenia powodujące zmiany w onkogenach oraz genach hamowania nowotworów komórek somatycznych, są odpowiedzialne za wywoływanie raka u ludzi oraz zwierząt doświadczalnych.

Rutynowo w badaniach tych wykorzystuje się gryzonie. Docelową komórką w tym badaniu jest szpik kostny, ze względu na to, że jest on wysoce unaczynioną tkanką oraz zawiera populacje komórek o szybkich cyklach, które mogą być bez trudu wyizolowane oraz poddane działaniu substancji. Inne gatunki oraz tkanki docelowe nie są przedmiotem wykorzystania tej metody.

To badanie chromosomowej aberracji ma szczególne znaczenie w odniesieniu do oceny zagrożenia mutagennego, w związku z czym pozwala ono na wykorzystanie stężenia czynników metabolizmu *in vivo*, farmakokinetyków oraz procesów naprawy DNA, chociaż mogą one różnić się od siebie w zależności od gatunku oraz tkanek. Badanie *in vivo* jest również użyteczne w odniesieniu do dalszych badań wyników mutagennych wykrytych w badaniu *in vitro*.

Jeżeli istnieje dowód na to, że substancja badana lub metabolit reakcyjny nie dotrze do tkanki docelowej, niewłaściwe jest wykorzystanie tej metody.

Patrz również: Ogólne wprowadzenie do Części B.

1.2. DEFINICJE

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu, wyrażone jako pękanie pojedynczych chromatydów lub pękanie oraz ponowne łączenie między chromatydami.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu, wyrażone jako pękanie pojedynczych chromatydów lub pękanie oraz ponowne łączenie obu chromatydów w identycznej lokalizacji.

Endoreduplikacja: proces, w którym po okresie replikacji DNA jądro nie ulega mitozie, ale rozpoczyna nowy okres S. Wynikiem są chromosomy o 4, 8, 16… chromatydach.

Szczelina: achromatyczne uszkodzenie mniejsze niż szerokość chromatydu, powodująca minimalne wypaczeniu chromatydu(-ów).

Aberracja liczbowa: zmiana w ilości chromosomów w odniesieniu do normalnej ilości charakterystycznej dla wykorzystywanych komórek.

Poliploidalność: wielokrotność ilości chromosomów haploidalnych (n) inna niż liczba diploidalna (np. 3 *n*, 4 *n* itd.).

Aberracja strukturalna: zmiana w strukturze chromosomu, wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy podziału komórek, zaobserwowana jako usunięcia oraz fragmenty, zmiany (zachodzące — wewnątrz oraz między chromosomami)

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zwierzęta są poddane działaniu substancji badanej odpowiednią drogą oraz są uśmiercane w odpowiednim czasie po badaniu. Przed uśmierceniem, zwierzęta są poddane działaniu metafazy zatrzymującej substancje (np. Colcemid® lub kolchicyna). Następnie dokonuje się przygotowania chromosomu ze szpiku kostnego oraz zabarwienia, a komórki metafazy są analizowane w odniesieniu do aberracji chromosomowej.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Preparaty**

1.4.1.1. *Wybór gatunku zwierząt*

Szczury, myszy i chomiki chińskie są powszechnie wykorzystywane, chociaż może zostać wykorzystany każdy odpowiedni gatunek ssaków. Powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy młodych zdrowych dorosłych zwierząt powinny zostać wykorzystane w badaniu. W czasie przeprowadzania badania różnice w masie zwierząt powinny być minimalne oraz nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy każdej płci.

1.4.1.2. *Warunki pobytu i karmienia*

Ogólne warunki określone w ogólnym wprowadzeniu do Części B mają zastosowanie, chociaż celem w odniesieniu do wilgotności powinien być poziom wilgotności 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparaty zwierzęce*

Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przypisane do grup kontrolnych oraz grup poddanych działaniu substancji. Klatki powinny zostać przygotowane w sposób minimalizujący możliwe skutki negatywne wynikające z umieszczenia w klatce. Zwierzęta są identyfikowane oraz aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przynajmniej przez okres pięciu dni.

1.4.1.4. *Przygotowanie dawek*

Substancje badane stałe powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli stosowne, przed dozowaniem zwierzętom. Substancje badane płynne mogą być dawkowane bezpośrednio lub mogą zostać rozpuszczone przed dawkowaniem. Powinny zostać wykorzystane świeżo przygotowane substancje, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

1.4.2. **Warunki badania**

1.4.2.1. *Rozpuszczalnik/nośnik*

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać skutków toksycznych przy wykorzystywanych dawkach oraz nie powinien mieć możliwości reagowania chemicznego z substancją badaną. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

1.4.2.2. *Kontrole*

Równoległe kontrole pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik/nośnik) powinny zostać przeprowadzone w odniesieniu do każdej płci w ramach każdego badania. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być przedmiotem identycznych działań w porównaniu ze zwierzętami w grupie poddanej działaniu substancji.

Kontrole pozytywne powinny wywoływać strukturalne aberracje *in vivo* przy poziomie poddania działaniu substancji, w odniesieniu do którego oczekuje się wykrywalnego wzrostu powyżej tło. Dawki kontroli pozytywnych powinny zostać dobrane tak, aby wyniki były jasne, ale by badającemu nie ujawniały bezpośrednio tożsamości sporządzonych szkiełek mikroskopowych. Dopuszczalne jest, aby pozytywne kontrole podawane były inną drogą niż substancje badane oraz aby ich próbki pobierane były tylko jeden raz.

Wykorzystanie substancji chemicznych kontroli pozytywnych powiązanych z klasą chemiczną może być brane pod uwagę, jeżeli są one dostępne. Przykłady substancji pozytywnych kontroli obejmują:

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
metanosulfonat etylu	62–50–0	200–536–7
nitrozomocznik etylu	759–73–9	212–072–2
mitomycyna C	50–07–7	200–008–6
cyklofosfamid	50–18–0	200–015–4
cyklofosfamid monohydrat	6055–19–2	
trietylenomelamina	51–18–3	200–083–5

Negatywne kontrole z poddaniem działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a w innych przypadkach poddanie działaniu w ten sam sposób jak grupy poddane działaniu substancji, powinny zostać objęte każdorazowym pobieraniem próbek, chyba że zmienność oraz częstotliwości komórek z aberracjami chromosomowymi są dostępne w historycznych danych dotyczących kontroli. Jeżeli stosowane jest jednokrotne pobieranie próbek w odniesieniu do negatywnych kontroli, najbardziej odpowiednim czasem jest pierwsze pobranie próbek. Dodatkowo kontrole bez poddania działaniu substancji powinny być również wykorzystywane, chyba że istnieją historyczne lub opublikowane dane dotyczące kontroli wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych skutków szkodliwych lub mutagennych.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Liczba oraz płeć zwierząt**

Każda z poddanych działaniu substancji oraz kontrolnych grup obejmuje przynajmniej pięć nadających się do poddania analizie zwierząt każdej płci. Jeżeli w czasie badania istnieją dostępne dane z badań naukowych dotyczących tego samego gatunku oraz z wykorzystaniem tej samej drogi poddania działania substancji, które wykazują, że nie istnieją zasadnicze różnice w toksyczności między płciami, wówczas badanie na jednej płci będzie wystarczające. W przypadku gdy poddanie człowieka działaniu substancji chemicznej może być zależne od płci, jak na przykład w odniesieniu do niektórych czynników środków farmaceutycznych, badanie powinno zostać przeprowadzone na zwierzętach odpowiedniej płci.

1.5.2. **Harmonogram poddawania działaniu substancji**

Substancje badane są podawane przede wszystkim jako pojedynczy zabieg. Substancje badane mogą być również podawane jako dawka rozbita na części, np. dwa zabiegi, tego samego dnia w odstępie nie dłuższym niż kilku godzin, w celu ułatwienia podawania jako duża objętość substancji. Inne reżimy dawki powinny zostać naukowo uzasadnione.

Próbki powinny być pobierane dwukrotnie w ciągu jednego dnia po poddaniu działaniu substancji. W odniesieniu do gryzoni pierwszy odstęp czasu między pobieraniem trwa 1,5 długości normalnego cyklu komórkowego (ten ostatni trwa przeciętnie 12-18 godzin) po poddaniu działaniu substancji. Ze względu na to, że czas wymagany na pobór oraz przemianę materii substancji badanej, jak również jej skutki na kinetykę cyklu komórkowego może wpływać na optymalny czas wykrywania aberracji chromosomowej, zalecane jest późniejsze pobieranie próbek w 24 godziny po pobraniu pierwszej próbki. Jeżeli wykorzystywane są reżimy dawki większe niż jeden dzień, zastosowany powinien zostać jeden okres pobierania próbek w czasie 1,5 długości trwania normalnego cyklu komórkowego po przeprowadzeniu końcowego poddania działaniu substancji.

Przed uśmierceniem zwierzętom wstrzykuje się wewnątrzotrzewnowo odpowiednią dawkę czynnika zatrzymującego metafazę (np. Colcemid® lub kolchicyna). W następnej kolejności pobiera się próbki od zwierząt w odpowiednich odstępach czasu. W odniesieniu do myszy odstęp czasu między pobieraniem próbek wynosi 3-5 godzin; w odniesieniu do chomików ten odstęp czasu wynosi 4-5 godzin. Komórki są pobierane ze szpiku kostnego oraz analizowane pod kątem występowania aberracji chromosomowych.

1.5.3. **Poziomy dawek**

Jeżeli zakres badań jest przeprowadzanych ze względu na to, że nie istnieją dostępne odpowiednie dane, powinny być one prowadzone w tym samym laboratorium, wykorzystując ten sam reżim gatunku, szczepu, płci oraz poddawania działaniu substancji, który ma zostać zastosowany do głównego badania (5). Jeżeli istnieje toksyczność, trzy poziomy dawek są stosowane w odniesieniu do pierwszego okresu pobierania próbek. Trzy poziomy dawek powinny objąć zakres od maksimum do niskiej toksyczności lub do jej braku. W trakcie późniejszego okresu pobierania próbek muszą zostać wykorzystane jedynie najwyższe dawki. Najwyższa dawka jest określona jako dawka wywołująca oznaki toksyczności, a wyższe poziomy dawek oparte na tym samym reżimie dawkowania mogłyby być śmiertelne. Substancje o szczególnej aktywności biologicznej przy niskich nietoksycznych dawkach (takie jak hormony i mitogeny) mogą stanowić wyjątek w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków. Najwyższa dawka może być również określona jako dawka, która wywołuje pewne wskazania toksyczności w szpiku kostnym (np. wyższa niż 50 % redukcja indeksu mitotycznego).

1.5.4. **Badanie ograniczone**

Jeżeli badanie w oparciu o jeden poziom dawek o przynajmniej 2 000 mg/kg masy ciała wykorzystujące pojedyncze poddanie działaniu substancji, lub jak dwa zabiegi poddania działaniu substancji tego samego dnia, nie daje dostrzegalnych wyników toksycznych, oraz jeżeli nie podejrzewa się genotoksyczności w oparciu o dane dotyczące substancji powiązanych strukturalnie, wówczas przeprowadzenie pełnego badania może nie być konieczne. W odniesieniu do badań o dłuższym czasie trwania, ograniczenie dawki wynosi 2 000 mg/kg/masa ciała/dzień w odniesieniu do poddawania działaniu substancji trwającego do 14 dni, oraz 1 000 mg/kg/masa ciała/dzień w odniesieniu do poddawania działaniu substancji trwającego dłużej niż 14 dni. Spodziewa się, iż poddanie człowieka działaniu substancji może wykazać potrzebę wykorzystania większej dawki w badaniu ograniczonym.

1.5.5. **Dawkowanie**

Substancja badana jest zazwyczaj podawana przez zgłębnik żołądkowy lub odpowiednią rurkę intubacyjną, lub przez wstrzyknięcie wewnątrzotrzewnowe. Inne drogi poddania działaniu substancji mogą być dopuszczalne w przypadku gdy ich wykorzystanie jest uzasadnione. Maksymalna objętość płynu, jaka może być podana przez zgłębnik lub wstrzyknięta jednorazowo zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 2 ml/100g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż te musi być uzasadnione. Z wyjątkiem podrażniających lub żrących substancji, które zazwyczaj ujawniają zwiększone skutki o dużym stężeniu, zmienności w objętości substancji badanej powinny zostać zminimalizowane przez dostosowanie stężenia w celu zapewnienia stałej objętości przy wszystkich poziomach dawek.

1.5.6. **Preparaty chromosomów**

Zaraz po uśmierceniu zwierzęcia, uzyskuje się szpik kostny, poddany działaniu roztworu hipotonicznego oraz ustabilizowany. Komórki są następnie rozmieszczane na szkiełku mikroskopu i barwione.

1.5.7. **Analiza**

Indeks mitotyczny powinien zostać oznaczony jako miara cytotoksyczności w przynajmniej 1 000 komórek na zwierzę w odniesieniu do wszystkich poddanych działaniu substancji zwierząt (łącznie z pozytywnymi kontrolami) lub kontrolowanych zwierząt, które nie zostały poddane działaniu substancji.

Przynajmniej 100 komórek powinno zostać poddane analizie w odniesieniu do każdego zwierzęcia. Liczba ta może zostać zmniejszona, jeśli zaobserwowano dużą liczbę aberracji. Wszystkie szkiełka mikroskopowe, w tym dotyczące negatywnych i pozytywnych kontroli, powinny być niezależnie zakodowane przed analizą mikroskopową. Ponieważ procedury przygotowania szkiełka mikroskopowego często skutkują przerwaniem proporcji między metafazą ze stratą chromosomów, oceniane komórki powinny z tego względu zawierać pewną liczbę centromerów równą 2n ± 2.

2. **DANE**

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Dane dotyczące poszczególnych zwierząt powinny zostać przedstawione w formie tabelarycznej. Jednostką doświadczalną jest zwierzę. W odniesieniu do każdego zwierzęcia ocenione powinny zostać: liczba ocenionych komórek, liczba aberracji przypadających na komórkę oraz udział procentowy komórek ze strukturalnymi aberracjami chromosomowymi. Różne typy strukturalnej aberracji chromosomowej powinny być wymienione wraz z ich ilościami oraz częstotliwościami w odniesieniu do grupy poddanej działaniu substancji oraz kontrolnej. Szczeliny są oddzielnie odnotowywane oraz zgłaszane, ale ogólnie nie są włączane do częstotliwości aberracji ogółem. Jeżeli nie ma dowodu na różnicę między płciami, dane dotyczące obu płci mogą zostać połączone dla przeprowadzenia analizy statystycznej.

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany z dawką wzrost odpowiedniej ilości komórek z aberracjami chromosomowymi lub wyraźny wzrost w ilości komórek z aberracjami w grupie pojedynczej dawki przy jednym okresie pobierania próbek. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Metody statystyczne mogą zostać wykorzystane jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (6). Znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej. Wyniki niejednoznaczne powinny zostać wyjaśnione przez dalsze badanie, w szczególności z wykorzystaniem modyfikacji warunków doświadczalnych.

Wzrost liczby komórek poliploidalnych może wskazywać, że substancja badana ma potencjał wywoływania liczbowych aberracji chromosomowych. Wzrost endoreduplikacji chromosomami może wskazywać, że substancje badane mają potencjał wstrzymywania postępowania cyklu komórkowego (7) (8).

Substancja badana, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w tym badaniu.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawała w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych wyklucza dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności badanej substancji. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od liczby powtórzonych doświadczeń.

Wyniki pozytywne z badania aberracji chromosomowej wskazują, że substancja badana wywołuje chromosomową aberrację w szpiku kostnym badanych gatunków. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych substancja badana nie pobudza aberracji chromosomowej w szpiku kostnym badanych zwierząt.

Prawdopodobieństwo, że substancja badana lub jej metabolity docierają do ogólnego obiegu lub w szczególności do tkanki docelowej (np. toksyczność systemowa), powinno zostać wzięte pod uwagę.

3. SPRAWOZDAWCZOŚĆ

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli jest znana.

Badane zwierzęta:

— gatunek/szczep wykorzystany,

— liczba, wiek oraz płeć zwierząt,

— źródło, warunki przetrzymywania, odżywianie itp.,

— indywidualna masa zwierzęcia na początku badania, łącznie z zakresem masy ciała, średnimi oraz standardowymi odchyleniami dla każdej grupy.

Warunki badania:

— pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik/nośnik) kontrole,

— dane z zakresu studium dotyczącego określania zakresu badania, jeżeli zostały przeprowadzone,

— racjonalne uzasadnienie w odniesieniu do zamkniętego wyboru dawek,

— szczegóły dotyczące przygotowania substancji badanej,

— szczegóły dotyczące podawania substancji badanej,

— racjonalne uzasadnienie w odniesieniu do drogi podawania,

— metody sprawdzania, czy substancja badana dotarła do ogólnego obiegu lub tkanki docelowej, jeżeli ma zastosowanie,

— zmiana stężenia substancji badanej w odżywianiu/wodzie pitnej (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg masy ciała/dzień), jeżeli ma zastosowanie,

— szczegóły dotyczące jakości pokarmu oraz wody,

— szczegółowy opis harmonogramów poddawania działaniu substancji oraz pobierania próbek,

— metody pomiarów toksyczności,

— tożsamość metafazy zatrzymującej substancje, jej stężenie oraz czas trwania poddania działaniu substancji,

— metody przygotowania szkiełek mikroskopowych,

— kryteria w odniesieniu do aberracji oceniającej,

— liczba komórek objętych analizą przypadająca na zwierzę,

— kryteria uznawania badań za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

— oznaki toksyczności,

— indeks mitotyczny,

— typ oraz liczba aberracji, podane oddzielnie dla każdego zwierzęcia,

— liczba aberracji ogółem na grupę ze średnimi i standardowymi odchyleniami,

— liczba komórek z aberracjami na grupę ze średnimi i standardowymi odchyleniami,

— zmiany poliploidalności, jeżeli są znane,

— relacja miedzy dawką a reakcją, w miarę możliwości,

— analizy statystyczne, jeżeli istnieją,

— dane dotyczące równoległych kontroli negatywnych,

— historyczne dane dotyczące negatywnych kontroli, z zakresami, średnimi oraz standardowymi odchyleniami,

— dane dotyczące równoległych pozytywnych kontroli.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **ODNIESIENIA**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, w: *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, w: 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, w: *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."

ZAŁĄCZNIK 4C

„B.12. MUTAGENNOŚĆ — BADANIE MIKROJĄDROWE ERYTRYOCYTÓW *IN VIVO* U SSAKÓW

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 474, Metody badania mikrojądrowego erytrocytów *in vivo* u ssaków (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Badanie mikrojądrowe erytrocytów u ssaków *in vivo* jest wykorzystywane w celu wykrycia uszkodzeń wywołanych przez chromosomy lub aparat mitotyczny erytroblastów przez analizę erytrocytu pobranego jako próbka szpiku kostnego lub komórek krwi obwodowej zwierząt, zazwyczaj gryzoni.

Celem badania mikrojądrowego jest identyfikacja substancji powodujących cytogenetyczne uszkodzenia, które skutkują formowaniem się mikrojądra zawierającego okrywające fragmenty chromosomów lub całe chromosomy.

Kiedy w erytroblaście szpiku kostnego rozwija się w erytrocyt polichromatyczny, główne jądro jest wyrzucane; każde mikrojądro, które zostało uformowane, może pozostać poza cytoplazmą poddaną w inny sposób tworzeniu się zarodników. Wizualizacja mikrojądra jest ułatwiona w tych komórkach, ponieważ brak im głównego jądra. Wzrost częstotliwości mikrojądrowych polichromicznych erytrocytów w zwierzętach poddanych działaniu substancji jest wskazaniem wywołanego uszkodzenia chromosomu.

Szpik kostny gryzoni jest rutynowo wykorzystywany w tych badaniach ze względu na to, że erytrocyty polichromiczne produkowane są w tej tkance. Pomiar mikrojądrowych niedojrzałych (polichromicznych) erytrocytów w krwi obwodowej jest na równi dopuszczalny w odniesieniu do jakiegokolwiek gatunku, co do którego wykazana została niezdolność śledziony do usunięcia mikrojądrowego erytrocytu lub który wskazał odpowiednią czułość w celu wykrywania czynników, które powodują strukturalne lub liczbowe aberracje chromosomowe. Mikrojądro może być wyróżnione w oparciu o różne kryteria. Obejmują one identyfikacje obecności lub nieobecności kinetochoru lub centromeru DNA w mikrojądrze. Częstotliwość mikrojądrowych niedojrzałych (polichromicznych) erytrocytów jest głównym punktem końcowym. Liczba dojrzałych erytrocytów w krwi obwodowej, które zawierają mikrojądro, pośród danej ilości dojrzałych erytrocytów może być również wykorzystana jako punkt końcowy oznaczania, jeśli zwierzęta są poddawane działaniu substancji przez cztery tygodnie lub dłużej.

To badanie mikrojądrowe erytrocytów u ssaków *in vivo* ma szczególne znaczenie dla oceniania zagrożenia, w związku z czym pozwala ono na stężenie czynników metabolizmu farmakokinetyków oraz procesów naprawy DNA chociaż mogą one różnić się wzajemnie w zależności od gatunku oraz tkanek, oraz genetycznych punktów końcowych. Badanie *in vivo* jest również użyteczne w odniesieniu do dalszych badań skutków mutagennych wykrytych w systemie *in vitro*.

Jeżeli istnieje dowód na to, że substancja badana lub metabolit reakcyjny nie dotrze do tkanki docelowej, niewłaściwe jest wykorzystanie tego badania.

Patrz również: Ogólne wprowadzenie do części B.

1.2. DEFINICJE

Centromer (Kinetochor): region(-y) chromosomu, w którym(-ch) mikrotubule wrzeciona podziałowego są asocjowane w trakcie podziału komórki, dopuszczając uporządkowane przemieszczanie się chromosomów potomnych do biegunów komórek potomnych.

Mikrojądra: małe jądra, oddzielone oraz występujące dodatkowo w stosunku do jądra głównego komórek, wytwarzane w trakcie telofazy mitozy (mejozy) przez okrywające fragmenty chromosomów lub całe chromosomy.

Erytrocyt normochromiczny: dojrzały erytrocyt, któremu brakuje rybosomów oraz może być odróżniony od niedojrzałego, polichromatycznych erytrocytów przez szczepy wybiórczo w odniesieniu dla rybosomów.

Erytrocyt polichromiczny: niedojrzały erytrocyt, w pośrednim stadium rozwoju, który nadal zawiera rybosomy i z tego względu może zostać odróżniony od dojrzałych, normochromicznych erytrocytów, dzięki plamom selektywnym dla rybosomów.

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zwierzęta są poddane działaniu substancji badanej odpowiednią drogą. Jeżeli wykorzystywany jest szpik kostny, zwierzęta są uśmiercane w odpowiednim czasie po poddaniu działaniu substancji, pobiera się szpik kostny, sporządzane są preparaty oraz dokonuje się barwienia (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Kiedy wykorzystywana jest krew obwodowa, krew pobierana jest w odpowiednim czasie po poddaniu działaniu substancji, oraz sporządzane są i barwione preparaty wymazowe (4) (8) (9) (10). W odniesieniu do badań z krwią obwodową, powinno upłynąć możliwie jak najmniej czasu między ostatnim poddaniem działaniu substancji, a pobraniem komórek. Preparaty są analizowane pod kątem obecności mikrojądra.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Preparaty**

1.4.1.1. *Wybór gatunku zwierząt*

Szczury lub myszy są zalecane, jeśli wykorzystywany jest szpik kostny, chociaż może zostać wykorzystany każdy odpowiedni gatunek ssaków. Jeśli wykorzystywana jest krew obwodowa, zalecane są myszy. Jednakże może zostać wykorzystany każdy odpowiedni gatunek ssaków pod warunkiem, że jest gatunkiem, w którym śledziona nie usuwa mikrojądrowych erytrocytów lub gatunkiem, który wykazał czułość odpowiednią do wykrycia czynników powodujących strukturalne lub liczbowe aberracje chromosomowe. Powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy młodych zdrowych dorosłych zwierząt powinny zostać wykorzystane w badaniu. W czasie przeprowadzania badania, różnice w masie zwierząt powinny być minimalne i nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy każdej płci.

1.4.1.2 *Warunki przetrzymywania i karmienia*

Ogólne warunki określone w ogólnym wprowadzeniu do części B są stosowane, chociaż celem w odniesieniu do wilgotności powinien być poziom 50-60 %.

1.4.1.3. *Przygotowanie zwierząt*

Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przypisane do grup kontrolnych oraz grup poddanych działaniu substancji. Zwierzęta są identyfikowane w niepowtarzalny sposób. Zwierzęta są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przynajmniej przez pięć dni. Klatki powinny zostać przygotowane w sposób minimalizujący możliwe negatywne skutki wynikające z umieszczenia w klatce.

1.4.1.4. *Przygotowanie dawek*

Substancje badane stałe powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli to stosowne, przed dawkowaniem zwierzętom. Substancje badane płynne mogą być dawkowane bezpośrednio lub mogą zostać rozpuszczone przed dawkowaniem. Powinny zostać wykorzystane świeżo przygotowywane substancje, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

1.4.2. **Warunki badania**

1.4.2.1. *Rozpuszczalnik/nośnik*

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać skutków toksycznych przy wykorzystywanych poziomach dawek oraz nie powinien mieć możliwości reagowania chemicznego z substancją badaną. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

1.4.2.2. *Kontrole*

Równoległe kontrole pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik/nośnik), powinny zostać przeprowadzone w odniesieniu do każdej płci w ramach każdego badania. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być przedmiotem identycznych działań w porównaniu ze zwierzętami w grupie poddanej działaniu substancji.

Kontrole pozytywne powinny wytwarzać mikrojądro przy poziomie poddania działaniu substancji, w odniesieniu do którego oczekuje się wykrywalnego wzrostu względem tła. Dawki kontroli pozytywnych powinny zostać wybrane tak, aby wyniki były jasne, ale nie ujawniały bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych badającemu. Dopuszczalne jest, aby pozytywne kontrole podawane były inną drogą niż substancje badane oraz aby ich próbki pobierane były tylko jeden raz. Dodatkowo wykorzystanie substancji chemicznych pozytywnych powiązanych z klasą chemiczną kontroli może być brane pod uwagę, jeżeli są one dostępne. Przykłady pozytywnych substancji kontrolnych obejmują:

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
etyl metanosulfonowy	62–50–0	200–536–7
N-etylo-N-nitrozomocznik	759–73–9	212–072–2
mitomycyna C	50–07–7	200–008–6
cyklofosfamid cyclofosfamid monohydrat	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
trietyleneomelamina	51–18–3	200–083–5

Negatywne kontrole z poddaniem działaniu samego rozpuszczalnika lub nośnika, a w innych przypadkach poddane działaniu w ten sam sposób jak grupy poddane działaniu substancji, powinny zostać objęte każdorazowym pobieraniem próbek, chyba że dopuszczalna zmienność oraz częstotliwości komórek z aberracjami chromosomowymi są dostępne z historycznych danych dotyczących kontroli. Jeżeli stosowane jest jednokrotne pobieranie próbek w odniesieniu do negatywnych kontroli, najbardziej odpowiednim czasem jest pierwszy okres pobrania próbek. Dodatkowo kontrole bez poddania działaniu substancji powinny być również wykorzystywane, chyba że istnieją historyczne lub opublikowane dane dotyczące kontroli wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie wywołuje żadnych skutków szkodliwych lub mutagennych.

Jeżeli wykorzystywana jest krew obwodowa, dopuszczalna może być również próbka sprzed poddania działaniu substancji jako równoległa kontroli negatywnej, ale tylko w krótkich badaniach krwi obwodowej (np. 1-3 zabiegów poddania działaniu substancji), jeśli wynikające z badania dane mieszczą się w spodziewanym zakresie w odniesieniu do kontroli historycznych.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Liczba oraz płeć zwierząt**

Każda z poddanych działaniu substancji oraz kontrolnych grup obejmuje przynajmniej pięć nadających się do poddania analizie zwierząt z każdej płci (11). Jeżeli w czasie badania istnieją dostępne dane z badań naukowych dotyczących tego samego gatunku oraz z wykorzystaniem tej samej drogi poddania działania substancji, które wykazują, że nie istnieją zasadnicze różnice w toksyczności między płciami, wówczas badanie na jednej płci będzie wystarczające. Gdy poddanie człowieka działaniu substancji chemicznej może być zależne od płci, jak na przykład w odniesieniu do niektórych środków farmaceutycznych, badanie powinno zostać przeprowadzone na zwierzętach odpowiedniej płci.

1.5.2. **Harmonogram poddawania działaniu substancji**

Nie można zalecić żadnego harmonogramu poddawania działaniu substancji (np. jeden, dwa albo więcej zabiegów poddawania działaniu substancji w 24-godzinnych odstępach czasu). Próbki z rozszerzonych reżimów dawkowania są dopuszczalne, o ile wykazane zostały pozytywne wyniki w odniesieniu do tego badania, w odniesieniu do badania negatywnego, o ile wykazana została toksyczność lub została wykorzystana dawka ograniczona oraz kontynuowano dawkowanie do momentu okresu pobierania próbek. Substancja badana może być również podawana jako dawka podzielona, np. dwa zabiegi poddania działaniu substancji tego samego dnia, w odstępie nie więcej niż kilku godzin, w celu ułatwienia podawania dużej objętości substancji.

Badanie można przeprowadzić na dwa sposoby:

a) zwierzęta są poddawane działaniu substancji badanej jeden raz. Próbki szpiku kostnego są pobierane przynajmniej dwukrotnie, rozpoczynając nie wcześniej niż w 24 godziny po poddaniu działaniu substancji badanej, ale nie przedłużając poza okres 48 godzin po poddaniu działaniu substancji badanej z odpowiednimi odstępami czasu między pobieraniem próbek. Stosowanie próbek wcześniej niż 24 godziny po leczeniu powinno być uzasadnione. Próbki krwi obwodowej są pobierane przynajmniej

dwukrotnie, rozpoczynając nie wcześniej niż w 36 godzin po poddaniu działaniu substancji badanej z odpowiednimi odstępami czasu po pobraniu pierwszej próbki, ale nie przedłużającymi się powyżej 72 godzin. Jeżeli rozpoznano pozytywną reakcję przy jednym okresie pobierania próbek, nie jest wymagane dodatkowe pobieranie próbek;

b) Jeżeli wykorzystywane są dwa lub więcej zabiegów poddawania działaniu substancji badanej dziennie (np. dwa lub więcej zabiegów poddawania działaniu substancji przy 24-godzinnych odstępach czasu), próbki powinny zostać zebrane w okresie między 18 a 24 godziną po końcowym poddaniu działaniu substancji w odniesieniu do szpiku kostnego oraz między 36 a 48 godziną po poddaniu działaniu substancji w odniesieniu do krwi obwodowej (12).

Można stosować dodatkowo inne okresy pobierania próbek, jeżeli są one odpowiednie.

1.5.3. **Poziomy dawek**

Jeżeli studium określające zakres badania jest przeprowadzane ze względu na to, że nie istnieją dostępne odpowiednie dane, powinno być ono prowadzane w tym samym laboratorium, wykorzystując ten sam reżim gatunku, szczepu, płci oraz poddawania działaniu substancji, który ma zostać zastosowany do głównego badania (13). Jeżeli istnieje toksyczność, trzy poziomy dawek są wykorzystywane w odniesieniu do pierwszego okresu pobierania próbek Te poziomy dawek powinny objąć zakres od najwyższej do niskiej toksyczności lub do jej braku. W trakcie późniejszego okresu pobierania próbek muszą zostać wykorzystane jedynie najwyższe dawki. Najwyższa dawka jest określona jako dawka wywołująca oznaki toksyczności, a wyższe poziomy dawek oparte na tych samych reżimach dotyczących dawkowania mogłyby być zabójcze. Substancje o szczególnej aktywności biologicznej przy niskich nietoksycznych dawkach (takie jak hormony i mitogeny) mogą stanowić wyjątek w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków. Najwyższa dawka może być również określona jako dawka, która wywołuje pewne wskazania toksyczności w szpiku kostnym (np. redukcja udziału niedojrzałych erytrocytów pośród erytrocytów ogółem w szpiku kostnym lub krwi obwodowej).

1.5.4. **Badanie ograniczone**

Jeżeli badanie w oparciu o jeden poziom dawek w odniesieniu do zwierząt o przynajmniej 2 000mg/kg masy ciała, wykorzystujące pojedyncze poddanie działaniu substancji lub dwa zabiegi poddania działaniu substancji tego samego dnia, nie daje dostrzegalnych skutków toksycznych, oraz jeżeli nie podejrzewa się genotoksyczności w oparciu o dane dotyczące substancji powiązanych strukturalnie, wówczas przeprowadzenie pełnego badania może nie być konieczne. W odniesieniu do badań o dłuższym czasie trwania, ograniczenie dawki wynosi 2 000mg/kg/masa ciała/dzień w odniesieniu do poddania działaniu substancji trwającego do 14 dni, oraz 1 000mg/kg/masa ciała/dzień w odniesieniu do poddania działaniu substancji trwającego dłużej niż 14 dni. Spodziewane poddanie człowieka działaniu substancji może wykazać potrzebę wykorzystania większej dawki w badaniu ograniczonym.

1.5.5. **Dawkowanie**

Substancja badana jest zazwyczaj podawana przez zgłębnik żołądkowy lub odpowiednią rurkę intubacyjną lub wstrzyknięcie wewnątrzotrzewnowe. Inne drogi poddania działaniu substancji mogą być dopuszczalne, w przypadku gdy ich wykorzystanie może być uzasadnione. Maksymalna objętość płynu, jaka może być podana przez zgłębnik lub wstrzyknięta jednorazowo, zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 2 ml/100g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych musi być uzasadnione. Z wyjątkiem podrażniających lub żrących substancji, które zazwyczaj ujawniają zwiększone skutki o wyższym stężeniu, zmienności w objętości substancji badanej powinny zostać zminimalizowane przez dostosowanie stężenia w celu zapewnienia stałej objętości przy wszystkich poziomach dawek.

1.5.6. **Przygotowanie szpiku kostnego/krwi**

Komórki szpiku kostnego są zazwyczaj uzyskiwane z kości udowych lub piszczeli bezpośrednio po uśmierceniu. Powszechnie, komórki są usuwane z kości udowych lub piszczeli, sporządzane są z nich preparaty oraz barwione wykorzystując ustalone metody. Krew obwodowa jest uzyskiwana z tętnicy szyjnej lub innego odpowiedniego naczynia krwionośnego. Komórki krwi są natychmiast barwione (8) (9) (10) lub sporządzane są preparaty wymazowe a następnie są barwione. Wykorzystanie szczególnego barwnika DNA (np. oranż akrydynowy (14) lub Hoechst 33258 plus pyronina-Y (15)) może wyeliminować niektóre spośród artefaktów związanych z barwnikiem nie nadającym się do szczególnego szczepu DNA. Ta korzyść nie wyklucza zastosowania zwykłych barwników (np. Giemsa). Dodatkowe systemy (np. kolumny celulozowe w celu usunięcia komórek jądrowych (16)) mogą być również wykorzystane pod warunkiem, że wykazano, iż systemy te odpowiednio działają w odniesieniu do przygotowywania mikrojądra w laboratorium.

1.5.7. **Analiza**

Udział niedojrzałych erytrocytów pośród ogółu (dojrzałych i niedojrzałych) erytrocytów jest oznaczana podliczając ogół przynajmniej 200 erytrocytów w odniesieniu do szpiku kostnego oraz 1 000erytrocytów w odniesieniu do krwi obwodowej (17). Wszystkie szkiełka mikroskopowe łącznie z tymi dotyczącymi pozytywnych i negatywnych kontroli powinny być niezależnie kodowane przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej. Przynajmniej 2 000niedojrzałych erytrocytów przypadających na zwierzę jest oceniane w odniesieniu do zapadalności niedojrzałych erytrocytów. Analizując szkiełka mikroskopowe, udział

niedojrzałych erytrocytów nie powinien być mniejszy niż, 20 % wartości kontrolnej. Jeżeli zwierzęta poddawane działaniu substancji nieprzerwanie przez cztery tygodnie lub dłużej, przynajmniej 2 000dojrzałych erytrocytów na zwierzę może zostać ocenione w odniesieniu do częstości występowania mikrojądra. Systemy automatycznej analizy (analiza obrazowa oraz przepływowa analiza cytometryczna zawiesin komórkowych) są dopuszczalne alternatywnie w odniesieniu do to oceny manualnej, jeżeli są odpowiednio uzasadnione oraz jeżeli stwierdzono ich ważność.

2. DANE

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Dane dotyczące poszczególnych zwierząt powinny zostać przedstawione w formie tabelarycznej. Liczba ocenionych niedojrzałych erytrocytów, liczba mikrojądrowych niedojrzałych erytrocytów oraz liczba niedojrzałych erytrocytów pośród erytrocytów ogółem powinna zostać wymieniona oddzielnie w odniesieniu do każdego zwierzęcia poddanego analizie. Jeżeli zwierzęta są poddawane działaniu substancji nieprzerwanie przez cztery tygodnie lub dłużej, dane dotyczące dojrzałych erytrocytów powinny zostać podane, jeżeli zostały one zebrane. Udział niedojrzałych erytrocytów pośród erytrocytów ogółem oraz, jeżeli uznaje się to za mające zastosowanie, udział procentowy mikrojądrowych erytrocytów podawany jest dla każdego zwierzęcia. Jeżeli nie ma dowodu na różnicę między płciami, dane dotyczące obu płci mogą zostać połączone celem przeprowadzenia analizy statystycznej.

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany z dawką wzrost w odpowiedniej ilości komórek z aberracjami chromosomowymi lub wyraźny wzrost w ilości komórek z aberracjami w grupie pojedynczej dawki przy jednym okresie pobierania próbek. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Metody statystyczne mogą zostać wykorzystane jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (18) (19). Znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej. Wyniki niejednoznaczne powinny zostać wyjaśnione przez dalsze badanie, w szczególności z wykorzystaniem modyfikacji warunków doświadczalnych.

Substancja badana, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w tym badaniu.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawało w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie wykluczał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności substancji badanej. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od ilości powtórzeń doświadczenia.

Wyniki pozytywne z badania mikrojądrowego wskazują, że substancja badana wywołuje powstanie mikrojądra, które jest wynikiem uszkodzenia chromosomowego albo uszkodzenia w erytroblaście badanego gatunku. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych, substancja badana nie produkuje mikrojądra w niedojrzałym erytrocycie badanego gatunku.

Prawdopodobieństwo, że substancja badana lub jej metabolity docierają do ogólnego obiegu lub w szczególności tkanki docelowej (np. toksyczność systemowa) powinno zostać rozpatrzone.

3. SPRAWOZDAWCZOŚĆ

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli jest znana.

Badane zwierzęta:

— gatunek/szczep wykorzystany,

— liczba, wiek oraz płeć zwierząt,

— źródło, warunki przetrzymywania, odżywianie itp.,

— indywidualna masa ciała zwierzęcia na początku badania, łącznie z zakresem masy ciała, średnimi oraz standardowymi odchyleniami dla każdej grupy.

Warunki badania:

— dane dotyczące pozytywnych i negatywnych (rozpuszczalnik/nośnik) kontroli,

— dane z zakresu studium określania zakresu badania, jeżeli zostało przeprowadzone,

— racjonalne uzasadnienie w odniesieniu do wyboru poziomu dawek,

— szczegóły dotyczące preparatów substancji,

— szczegóły dotyczące podawania substancji badanej,

— racjonalne uzasadnienie w odniesieniu do drogi podawania,

— metody sprawdzania, czy substancja testowa dotarła do ogólnego obiegu lub tkanki docelowej, jeżeli mają zastosowanie,

— zmiana stężenia substancji badanej w odżywianiu/wodzie pitnej (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg masy ciała/dzień), jeżeli ma zastosowanie,

— szczegóły dotyczące jakości pokarmu oraz wody,

— szczegółowy opis harmonogramów leczenia, oraz pobierania próbek,

— metody przygotowania slajdów,

— metody pomiarów toksyczności,

— kryteria w odniesieniu do oceniającej aberracji mikrojądrowych niedojrzałych erytrocytów,

— liczba przeanalizowanych komórek przypadająca na zwierzę,

— kryteria uznawania badań za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

— oznaki toksyczności,

— udział niedojrzałych erytrocytów pośród erytrocytów ogółem,

— liczba mikrojądrowych niedojrzałych erytrocytów podana oddzielnie w odniesieniu do każdego zwierzęcia,

— średnia ± mikrojądrowych niedojrzałych erytrocytów przypadająca na grupę,

— relacja miedzy dawką a reakcją, w miarę możliwości,

— analizy statystyczne, jeżeli istnieją,

— dane dotyczące równoległych oraz historycznych kontroli negatywnych,

— dane dotyczące równoległych pozytywnych kontroli.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **ODNIESIENIA**

(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, w: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Staticical Analysis of *In vivo* Cytogenetic Assays, w: 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."

ZAŁĄCZNIK 4D

„B.13/14. MUTAGENNOŚĆ — BADANIE MUTACJI POWROTNYCH W KOMÓRKACH BAKTERYJNYCH

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 471, badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych wykorzystuje aminokwasy wymagające szczepów *Salmonella typhimurium* oraz *Escherichia coli* w celu wykrycia mutacji punktowych, które obejmują zastępowanie (substytucja), dodanie lub usunięcie jednego lub większej liczby par zasad DNA (1) (2) (3). Zasadą tego badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych jest to, że wykrywa ono mutacje, które powodują powrót mutacji obecnych w badanych szczepach oraz przywracają funkcjonalną zdolność bakterii do syntezowania podstawowego aminokwasu. Odpowiednie bakterie są wykrywane przez ich zdolność do wzrostu w razie nieobecności aminokwasu wymaganego przez macierzysty badany szczep.

Mutacje punktowe są przyczyną wielu chorób genetycznych u ludzi oraz istnieje podstawowy dowód na to, że mutacje punktowe w onkogenach i genach hamujących nowotwory komórek somatycznych są odpowiedzialne za nowotwory u ludzi oraz zwierząt badanych. Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych jest szybkie, tanie oraz względnie proste do przeprowadzenia. Wiele szczepów badanych posiada wiele cech, które czynią je bardziej czułymi na wykrywanie mutacji łącznie z reakcyjnymi sekwencjami DNA w lokalizacjach powrotnych, wzmożoną przenikalnością do dużych cząsteczek oraz eliminacją systemów naprawy DNA lub wzmocnieniem procesu naprawy DNA skłonnego do błędów. Specyficzność badanych szczepów może zapewnić pewne użyteczne informacje w sprawie typów mutacji, które są wywołane czynnikami genotoksycznymi. Bardzo duża baza danych wyników w odniesieniu do szerokiej różnorodności struktur jest dostępna w odniesieniu do badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych oraz dobrze ustalone metodologie zostały opracowane w odniesieniu do badanych substancji chemicznych o różnych właściwościach fizyczno-chemicznych łącznie ze związkami lotnymi.

Patrz również: Ogólne wprowadzenie do części B.

1.2. DEFINICJE

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych w *Salmonella typhimurium* albo *Escherichia coli* wykrywa mutacje w szczepie wymagającym aminokwasów (histydyny lub tryptofanu, odpowiednio) w celu wytworzenia szczepu niezależnie od zewnętrznych dostaw aminokwasów.

Pary zasad podstawiania mutagenów są czynnikami, które powodują zasadowe zmiany w DNA. W badaniu powrotnym ta zmiana może wystąpić w miejscu oryginalnej mutacji lub w drugim miejscu w genomie bakteryjnym.

Mutageny powodujące zmiany fazy odczytu są czynnikami, które powodują dodanie lub usunięcie jednej lub większej liczby par zasad w DNA, zmieniając w ten sposób odczyt RNA.

1.3. WSTĘPNE ROZWAŻANIA

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych wykorzystuje komórki prokariotyczne, które różnią się od komórek ssaków takimi czynnikami jak pobór, przemiana materii, struktura chromosomowa procesy naprawy DNA. Badania przeprowadzane *in vitro* ogólnie wymagają wykorzystania egzogenicznego źródła aktywacji metabolicznej. Systemy aktywacji metabolicznej *in vitro* nie mogą naśladować całkowicie warunków *in vivo*. Badanie z tego względu nie dostarcza bezpośrednich informacji w sprawie potencjału mutagenności oraz rakotwórczości substancji u ssaków.

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych jest powszechnie wykorzystywane jako wstępny przegląd aktywności genotoksycznej oraz, w szczególności w odniesieniu aktywacji wywołującej mutacje punktowe. Rozległa baza danych wykazała, że wiele substancji chemicznych, które są pozytywne w tym badaniu, ujawniają również aktywność mutagenną w innych badaniach. Istnieją przykłady czynników mutagennych, które nie są wykryte przez to badanie, powody tych niedoborów mogą zostać przypisane

szczególnemu charakterowi wykrytego punktu końcowego, różnicom między aktywacją metaboliczną lub różnicom w biodostępności. Z drugiej strony czynniki, które wzmacniają wrażliwość badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych, mogą prowadzić do zbyt wysokiego oszacowania aktywność mutagennej.

Badanie mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych może być nieodpowiednie w odniesieniu do oceny niektórych klas substancji chemicznych, na przykład wysoce bakteriobójczych związków (np. niektóre antybiotyki) oraz tych, które uznaje się za (które znane są) zakłócające szczególnie system replikacji komórek ssaków (np. niektóre czynniki hamujące topoizomerazę oraz niektóre nuklozydowe substancje analogiczne). W takich przypadkach badanie mutacji u ssaków może być bardziej odpowiednie.

Chociaż wiele związków, które są pozytywne w tym badaniu, jest czynnikami rakotwórczymi dla ssaków, korelacja nie jest zupełna. Zależy to od klasy substancji chemicznej oraz istnieją czynniki rakotwórcze, które nie są wykrywane przez substancje badaną, ponieważ działają one przez inne niegenotoksyczne mechanizmy lub mechanizmy nieobecne w komórkach bakteryjnych.

1.4. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zawiesiny komórek bakteryjnych są poddane działaniu substancji badanej, w obecności oraz w nieobecności egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej. W metodzie włączania płytki te zawiesiny są zmieszane z nałożonym agarem oraz nakładane na minimalne podłoże. W odniesieniu do obu technik, po dwóch lub trzech dniach inkubacji, powrotne hodowle są podliczane oraz porównywane z ilością spontanicznie powracających hodowli na rozpuszczalnikowych płytkach kontrolnych.

Zostało opisanych wiele procedur w odniesieniu do przeprowadzania badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych. Wśród tych powszechnie wykorzystywanych znajdują się metoda włączająca płytkę (1) (2) (3) (4), metoda uprzedniej inkubacji (2) (3) (5) (6) (7) (8), metoda fluktuacji (9) (10), oraz metoda zawiesinowa (11). Zostały opisane modyfikacje w odniesieniu do badania gazów lub oparów (12).

Procedury opisane w tej metodzie odnoszą się przede wszystkim do metod włączenia płytki oraz uprzedniej inkubacji. Żadna z nich nie jest dopuszczalna w odniesieniu do przeprowadzania doświadczeń zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez niej. Niektóre substancje mogą zostać wykryte w bardziej skuteczny sposób wykorzystując metodę uprzedniej inkubacji. Substancje te należą do klas chemicznych, które obejmują nitrozaminy o krótkich łańcuchach, metale dwuwartościowe, aldehydy, barwniki azowe oraz związki diazowe oraz alkaloidy pirolizydynowe, związki allilowe oraz związki azotowe (3). Rozpoznano także, że niektóre klasy mutagenów nie są zawsze wykrywane wykorzystując procedury standardowe takie jak metoda włączająca płytki lub metoda uprzedniej inkubacji. Powinny być one uznawane za »szczególne przypadki« i silnie zalecane jest, iż powinny zostać wykorzystane alternatywne procedury. Następujące »szczególne przypadki« mogą zostać zidentyfikowane (wraz z przykładami procedur, które mogłyby zostać wykorzystane w odniesieniu do ich wykrycia) barwniki azowe oraz związki diazowe (3) (5) (6) (13), gazy oraz lotne substancje chemiczne (12) (14) (15) (16) oraz glikozydy (17) (18). Odchylenie od standardowej procedury musi zostać naukowo uzasadnione.

1.5. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.5.1. **Preparaty**

1.5.1.1. *Bakterie*

Świeże kultury bakterii powinny być hodowane do późnej fazy wykładniczej lub wczesnej fazy stacjonarnej wzrostu (w przybliżeniu 10^9 komórek na ml). Kultury bakteryjne w późnej fazie stacjonarnej nie powinny być wykorzystywane. Zasadnicze jest, aby kultury bakteryjne wykorzystywane w badaniu zawierały wysokie miano bakterii zdolnych do życia. Miano może być wykazane zarówno z historycznych danych dotyczących kontroli krzywych wzrostu, w każdym oznaczaniu przez określenie ilości zdolnych do życia komórek przez doświadczenie platerowania.

Zalecaną temperaturą inkubacji jest 37 °C.

Powinno zostać wykorzystane przynajmniej pięć szczepów bakterii. Powinno to obejmować cztery szczepy *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 lub TA97a lub TA97; TA98; oraz TA100) w które zostały pokazane jako mające być rzetelne oraz odtwarzalnie reagujące między laboratoriami. Te cztery szczepy *S. typhimurium* posiadają GC pary bazowe w miejscu podstawowego powrotu oraz wiadome jest, ze nie mogą one wykrywać utleniających mutagenów, czynników sieciujących oraz hydrazyny. Takie substancje mogą być wykrywane przez szczepy *E. coli* WP2 lub *S. typhimurium* TA102 (19) które posiadają pary zasad AT w miejscu podstawowego powrotu. Z tego względu zalecaną kombinacją szczepów jest:

— *S. typhimurium* TA1535, oraz

— *S. typhimurium* TA1537 lub TA97 lub TA97a, oraz

— *S. typhimurium* TA98, oraz

— *S. typhimurium* TA100, oraz

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

W celu wykrycia mutagenów sieciujących, preferowane może być objęcie TA102 lub dodanie wprawnych w naprawianie DNA szczepów *E. coli* (np. *E. coli* WP2 lub *E. coli* WP2 (pKM101)).

Powinny być wykorzystywane ustalone procedury przygotowania hodowli podstawowych, weryfikacja markerem oraz składowanie. Wymogi w odniesieniu do wzrostu, dotyczące aminokwasu powinny być wykazane dla każdego zamrożonego preparatu hodowli podstawowych (histydyna dla szczepów *S. typhimurium* oraz tryptofan dla szczepów *E. coli*). Inne właściwości fenotypowe powinny zostać sprawdzone w podobny sposób, mianowicie: obecność lub nieobecność plazmidów czynnika R gdzie stosowne (np. odporność na ampicylinę w szczepach TA98, TA100, oraz TA97a lub TA97, WP2 uvrA orazWP2 uvrA (pKM101), oraz odporność na ampicylinę + tetracyklinę w szczepie TA 102); (np. rfa mutacja w *S. typhimurium* przez wrażliwość na fiolet krystaliczny, oraz uvrA mutacja w *E. coli* lub uvrB mutacja w *S. typhimurium*, przez wrażliwość na światło ultrafioletowe) (2) (3). Szczepy powinny również wytwarzać spontaniczne kolonie powrotne w ramach zakresów częstotliwości oczekiwanych na podstawie historycznych danych laboratoryjnych oraz przeważnie w zakresie odnotowanym w literaturze.

1.5.1.2. *Podłoże*

Wykorzystywany jest odpowiedni minimalny agar (np. zawierające Vogel-Bonner minimalne podłoże E oraz glukoza) oraz powlekający agar zawierający histydynę oraz biotynę lub tryptofan w celu umożliwienia podziału kilku komórek (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Aktywacja metaboliczna*

Bakterie powinny być poddane działaniu substancji badanej zarówno w obecności, jak i w nieobecności odpowiedniego systemu aktywacji metabolicznej. Najbardziej powszechnie wykorzystywanym systemem jest uzupełniana współczynnikiem frakcja pomitochondrialna (S9) przygotowana z wątroby gryzoni poddanych działaniu czynników pobudzających enzymy takimi jak Aroklor 1254 (1) (2) lub kombinacją fenobarbitonu oraz B nafoflavonu (18) (20) (21). Frakcja pomitochondrialna jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie od 5 do 30 % objętościowo w mieszaninie S9. Wybór oraz warunki systemu metabolicznej aktywacji mogą być uzależnione od klasy badanej substancji chemicznej. W niektórych przypadkach właściwe może być wykorzystanie więcej niż jednego stężenia frakcji pomitochondrialnej. W odniesieniu do barwników azowych oraz związków diazowych, przy wykorzystaniu systemu aktywacji metabolicznej, może być bardziej odpowiednie (6) (13).

1.5.1.4. *Substancja testowa/preparat*

Stała substancja badana powinna zostać rozpuszczona lub zawieszona w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczona, jeżeli jest to odpowiednie przed poddaniem bakterii działaniu substancji. Płynne substancje badane mogą być dodawane bezpośrednio do systemu badawczego i/lub rozcieńczane przed poddaniem działaniu substancji. Powinny zostać wykorzystane świeże preparaty, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność składowania.

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien mieć możliwości reagowania chemicznego z substancją badaną oraz powinien być zgodny z przeżywaniem bakterii oraz aktywnością S9. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Badając substancje niestabilne w wodzie wykorzystane rozpuszczalniki organiczne powinny być wolne od wody.

1.5.2. **Warunki badawcze**

1.5.2.1. *Szczepy badane* (patrz ppkt. 1.5.1.1)

1.5.2.2. *Stężenie poddania działaniu substancji*

Wśród kryteriów, które mają być uwzględnione, oznaczając najwyższą ilość substancji badanej, które ma zostać wykorzystana, jest cytotoksyczność oraz rozpuszczalność w końcowej mieszaninie, której działaniu poddawane są szczepy.

Użyteczne może być oznaczenie toksyczności oraz nierozpuszczalności w doświadczeniu wstępnym. Cytotoksyczność może zostać wykryta przez redukcję ilości powrotnych hodowli, oczyszczenie lub zmniejszenie podłoża lub stopień przeżywania poddanych działaniu substancji hodowli. Cytotoksyczność substancji może być zmieniana w obecności systemów aktywacji metabolicznej. Nierozpuszczalność powinna zostać oceniona jako wytrącanie w końcowej mieszaninie w rzeczywistych warunkach badania oraz oczywistych dla oka nieuzbrojonego.

Zalecane najwyższe stężenie badawcze w odniesieniu do rozpuszczalnych niecytotoksycznych substancji stanowi 5mg/płytkę lub 5 µl/płytkę. W odniesieniu do niecytotoksycznych substancji, które nie są rozpuszczalne przy 5mg/płytkę lub 5 µl/płytkę, jedno lub więcej badanych stężeń powinno być nierozpuszczalne w końcowej mieszaninie cytotoksycznej. Strącanie nie powinno zakłócać oceny.

Przynajmniej pięć różnych nadających się do analizowania stężeń substancji badanej powinno zostać wykorzystane przy w przybliżeniu połowie logarytmu (np. √10) odstępów czasu między punktami badawczymi w odniesieniu do wstępnego doświadczenia. Krótsze odstępy czasu mogą być odpowiednie, jeśli reakcja stężenia jest badana. Badanie powyżej stężenia 5mg/płytkę lub 5 µl/płytkę może być brane pod uwagę oceniając substancje zawierające podstawowe ilości potencjalnie mutagennych zanieczyszczeń.

1.5.2.3. *Negatywne i pozytywne kontrole*

Równoległe specyficzne co do szczepu pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik lub nośnik) kontrole, zarówno z aktywacją metaboliczną jak i bez niej powinny być włączone w ramy każdego oznaczania. Powinien zostać przeprowadzony wybór uwzględniania pozytywnych kontroli, które wykazują skuteczne działanie każdego oznaczania.

W odniesieniu do oznaczeń wykorzystujących system metabolicznej aktywacji, substancja(-e) wzorcowa(-e) kontroli pozytywnych powinna(-y) zostać wybrana(-e) na podstawie typu wykorzystanego szczepu bakterii.

Następujące substancje stanowią przykłady odpowiednich substancji pozytywnych kontroli w odniesieniu do oznaczania z metaboliczna aktywacją:

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
9,10-dimetyloantracen	781–43–1	212–308–4
7,12-dimetylobenzo[a]antracen	57–97–6	200–359–5
benzo[a]piren	50–32–8	200–028–5
2-aminoantracen	613–13–8	210–330–9
cyclophosphamide	50–18–0	200–015–4
cyclophosphamide monohydrate	6055–19–2	

Następująca substancja jest odpowiednią kontrolą pozytywną w odniesieniu do metody redukcyjnej aktywacji metabolicznej:

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
Congo Red	573–58–0	209–358–4

2-aminoantracen nie powinien być wykorzystywany jako wyłączny wskaźnik skuteczności mieszaniny S9. Jeśli wykorzystywany jest 2-aminoantracen, każda partia S9 powinna być również charakteryzowana mutagenem, który wymaga metabolicznej aktywacji przez enzymy mikrosomowe, np. benzo[a]piren, dimetylobenzoantracen.

Następujące substancje są przykładami specyficznych co do szczepu kontroli pozytywnych dla badań przeprowadzanych bez egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej:

Substancje	Nr CAS	Einecs No	Szczep
azydek sodu	26628–22–8	247–852–1	TA 1535 i TA 100
2-nitrofluoren	607–57–8	210–138–5	TA 98
9-aminoakrydyna	90–45–9	201–995–6	TA 1537, TA 97 i TA 97a
ICR 191	17070–45–0	241–129–4	TA 1537, TA 97 i TA 97a
hydronadtlenek kumenu	80–15–9	201–254–7	TA 102
mitomycyna C	50–07–7	200–008–6	WP2 uvrA i TA 102
N-etylo-N-nitro-N-nitrozoguanidyna	70–25–7	200–730–1	WP2, WP2uvrA i WP2uvrA(pKM101)
1-tlenek 4-nitrokwinolinu	56–57–5	200–281–1	WP2, WP2uvrA i WP2uvrA(pKM101)
furylofuramide (AF2)	3688–53–7		Szczepy zawierające plazmidy

Mogą być wykorzystane inne odpowiednie substancje kontroli pozytywnych. Wykorzystanie substancji powiązanych klasą z substancjami kontroli pozytywnych powinno zostać uwzględnione, jeżeli są one dostępne.

Negatywne kontrole składające się z samego rozpuszczalnika lub nośnika bez substancji badanej oraz w innych przypadkach poddane działaniu w ten sam sposób jak grupy poddane działaniu substancji powinny zostać objęte kontrolą. Dodatkowo kontrole bez poddania działaniu substancji powinny być również wykorzystywane, chyba że istnieją historyczne dane dotyczące kontroli wykazujące, że brak szkodliwych lub mutagennych skutków wywoływanych wybranym rozpuszczalnikiem.

1.5.3. **Procedura**

W odniesieniu do metody włączającej płytkę (1) (2) (3) (4), bez aktywacji metabolicznej, zazwyczaj 0,05 ml lub 0,1 ml stężenia badawczego, 0,1 ml świeżej hodowli bakteryjnej (zawierającej w przybliżeniu 108 zdolnych do życia komórek) oraz 0,5 ml sterylnego bufora jest mieszane z 2,0 ml pokrywającego agaru. W odniesieniu do oznaczania z aktywacją metaboliczną, zazwyczaj 0,5 ml mieszaniny aktywacji metabolicznej zawierającej odpowiednie ilości pomitochondrialnej frakcji (w zakresie 5-30 % objętościowo w mieszaninie aktywacji metabolicznej) są mieszane z pokrywającym agarem (2,0 ml), łącznie z roztworem substancji badanej. Zawartości każdej z rurek są mieszane oraz wylewane na powierzchnię minimalnej płytki agarowej. Agar pokrywający krzepnie przed inkubacją.

W odniesieniu do metody uprzedniej inkubacji (2) (3) (5) (6), substancja badana/roztwór badany jest uprzednio inkubowany ze szczepem badanym (zawierającym w przybliżeniu 108 zdolnych do życia komórek) oraz sterylnym roztworem buforowym lub systemem metabolicznej aktywacji (0,5 ml) zazwyczaj przez 20 minut lub dłużej w temperaturze 30-37°C przed mieszaniem z pokrywającym agarem oraz polewając na powierzchnię minimalnej płytki agarowej. Zazwyczaj 0,05 lub 0,1 ml substancji badanej/roztworu badanego, 0,1 ml i bakterii oraz 0,5 ml mieszaniny S9 lub sterylnego roztworu buforowego są mieszane z 2,0 ml pokrywającego agaru. Rurki powinny zostać napowietrzone w trakcie uprzedniej inkubacji wykorzystując wstrząsarkę.

W odniesieniu do odpowiedniego szacowania zmienności, trzykrotne pokrywanie płytkami powinno zostać wykorzystane przy każdej dawce badanej. Wykorzystanie podwójnego pokrywania płytkami jest dopuszczalne, jeżeli jest to naukowo uzasadnione. Okazjonalna strata płytki niekoniecznie czyni oznaczanie nieważnym.

Gazowe lub lotne substancje powinny być badane odpowiednimi metodami, takimi jak np. w szczelnie zamkniętych naczyniach (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubacja**

Wszystkie płytki w danym oznaczeniu powinny być inkubowane w temperaturze 37 °C przez 48-72 godzin. Po okresie inkubacji podliczana jest liczba powrotnych kolonii.

2. **DANE**

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Dane powinny zostać przedstawione jako liczba kolonii przypadająca na płytkę. Liczba powrotnych kolonii zarówno w płytkach negatywnych (kontrola rozpuszczalnikowa oraz kontrola bez poddania działaniu substancji, jeżeli zostały wykorzystane), jak i pozytywnych kontroli powinny zostać również podane. Podlicza się poszczególne płytki, średnia liczba powrotnych kolonii przypadająca na płytkę powinna zostać przedstawiona w odniesieniu do substancji badanej oraz pozytywnej i negatywnej (bez poddania działaniu substancji badanej i/lub rozpuszczalnikowej) kontroli.

Nie istnieje wymóg jasnej reakcji pozytywnej w odniesieniu do weryfikacji. Niejednoznaczne wyniki powinny zostać wyjaśnione w drodze dalszych badań, w szczególności z wykorzystaniem modyfikacji warunków doświadczalnych. Wyniki negatywne muszą zostać potwierdzone na zasadzie jednostkowych przypadków. Modyfikacja parametrów badawczych w celu poszerzenia zakresu ocenionych warunków powinna zostać rozważona w dalszych doświadczeniach. Parametry badawcze, które mogą być zmodyfikowane obejmują zakres stężenia, metodę poddania działaniu substancji badanej (włączenie płytek lub uprzednia inkubacja) oraz warunki aktywacji metabolicznej.

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany z dawką wzrost ilości powrotnych kolonii powyżej zakres badanych i/lub odtwarzalności przy jednym lub większej ilości stężeń, przypadających na płytkę w przynajmniej jednym szczepie z lub bez systemu aktywacji metabolicznej. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Metody statystyczne mogą zostać wykorzystane jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (24). Jednakże znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej.

Substancja badana, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w tym badaniu.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawało w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie wykluczał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności badanej substancji. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od liczby powtórzonych doświadczeń.

Wyniki pozytywne z badania mutacji powrotnych w komórkach bakteryjnych wskazują, że substancja badana wywołuje mutacje punktowe przez zastąpienie lub mutacje fazy odczytu w genomie albo *Salmonella typhimurium* i/lub *Escherichia coli*. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych substancja badana nie jest mutagenna w badanym gatunku

3. **SPRAWOZDAWCZOŚĆ**

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczalnika/nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli jest znana.

Szczepy:

— wykorzystane szczepy,

— liczba komórek przypadająca na kulturę,

— właściwości szczepu.

Warunki badania:

— ilość substancji badanej przypadająca na płytkę (mg/płytkę lub µl/płytkę) wraz z racjonalnym uzasadnieniem wyboru dawki i liczby płytek przypadającej na stężenie,

— wykorzystane podłoże,

— rodzaj oraz skład systemu aktywacji metabolicznej, w tym dopuszczalność kryteriów,

— procedura poddania działaniu substancji badanej,

Wyniki:

— oznaki toksyczności,

— oznaki wytrącania,

— liczba poszczególnych płytek,

— średnia liczba powrotnych kolonii przypadających na kolonię oraz standardowe odchylenie,

— relacja miedzy dawką a reakcją, w miarę możliwości,

— analizy statystyczne, jeżeli istnieją,

— dane dotyczące równoległych oraz kontroli negatywnych i pozytywnych (rozpuszczalnik/nośnik), wraz z zakresami, średnimi oraz standardowymi odchyleniami,

— dane dotyczące historycznych kontroli negatywnych i pozytywnych, rozpuszczalnik/nośnik), wraz z zakresami, średnimi oraz standardowymi odchyleniami.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **ODNIESIENIA**

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

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

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

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

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

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, w: *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, w: *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, w: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam–New York–Oxford, pp. 141-161.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, w: *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, w: *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."

ZAŁĄCZNIK 4E

„B.17. MUTAGENNOŚĆ — BADANIE MUTACJI GENETYCZNEJ *IN VITRO* U SSAKÓW

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 476, Badania mutacji genetycznej *in vitro* u ssaków (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Badania mutacji genetycznej *in vivo* u ssaków może być wykorzystane w celu wykrycia mutacji genu wywołanej przez substancje chemiczne. Odpowiednie linie komórkowe włącznie z L5178Y mysimi komórkami chłoniaków, linie komórkowe chomika chińskiego CHO, CHO-AS52 oraz V79, oraz ludzkie komórki TK6 limfoblastoidu (1). W tych liniach komórkowych najbardziej powszechnie wykorzystywane pomiary genetycznych punktów końcowych przy kinazie tymidynowej (TK) oraz transferazie fosforybozylowej hypoksantyny-guaniny (HPRT), oraz transgenie transferazy fosforybozylowej ksantyny-guaniny (XPRT). Badania mutacji TK, HPRT oraz XPRT wykrywają różne widma zdarzeń genetycznych. Autosomalne umiejscowienie TK oraz XPRT może pozwolić na wykrycie zdarzeń genetycznych (np. dużych delecji) nie wykrywanych przy HPRT locus na X chromosomach (2)(3)(4)(5)(6).

W badaniu mutacji genetycznej *in vitro* u ssaków, mogą być wykorzystane hodowle ustanowionych linii komórkowych lub szczepy komórkowe. Wykorzystywane komórki wybierane są na podstawie zdolności do wzrostu w hodowli oraz stabilności spontanicznych częstotliwości mutacji.

Badania przeprowadzane *in vitro* wymagają ogólnie wykorzystania egzogenicznego źródła aktywacji metabolicznej. Ten system aktywacji metabolicznej nie może naśladować w całości warunków *in vivo* u ssaków. Powinna zostać zachowana ostrożność w celu uniknięcia warunków, które prowadziłyby do wyników nieodzwierciedlających wrodzonej mutagenności. Pozytywne wyniki, które nie odzwierciedlają wrodzonej mutagenności mogą wynikać ze zmian w pH, osmolalności lub wysokiego poziomu cytotoksyczności (7).

Badanie to jest wykorzystywane w celu wykrycia obecności możliwych mutagenów oraz czynników rakotwórczych dla ssaków. Wiele związków, które są pozytywne w tym badaniu są czynnikami rakotwórczymi dla ssaków, jednakże brak idealnego powiązania między tym badaniem oraz rakotwórczością. Powiązanie to jest zależne od klasy substancji chemicznej oraz istnieje wzrastający dowód na to, że istnieją czynniki rakotwórcze, które nie są wykrywane przez to badanie, ponieważ wydaje się, iż działają one przez inne, niegenotoksyczne mechanizmy lub mechanizmy, których brak w komórkach bakteryjnych (6).

Patrz także: Ogólne wprowadzenie do części B:

1.2. DEFINICJE

Mutacja powodująca zmianę bądź utratę aktywności białka: mutacja genu z rodzaju macierzystego mutanta, który powoduje zmianę lub stratę aktywności enzymatycznej funkcji zakodowanego białka.

Mutageny powodujące substytucję: substancje, które powodują zastąpienie jednego lub wielu par zasad DNA.

Mutageny powodujące mutacje zmiany fazy odczytu: Substancje, które powodują dodanie lub skreślenie pojedynczej lub wielu par nukleotydów w cząstce DNA.

Czas ekspresji fenotypowej: okres, w trakcie którego produkty genu niezmienionego są oddzielane od świeżo zmutowanej komórki.

Częstotliwość mutacji: liczba zaobserwowanych zmutowanych komórek podzielona przez liczbę komórek zdolnych do życia.

Względny wzrost całkowity: wzrost liczby komórek w czasie w porównaniu z populacją kontrolną komórek; obliczony jako stosunek względnego wzrostu czasu skuteczności kloningu negatywnych kontroli względem kontroli negatywnych.

Względny wzrost zawieszania: wzrost liczby komórek powyżej okresu ekspresji względem kontroli negatywnych.

Zdolność do życia: skuteczność kloningu komórek poddanych działaniu substancji w czasie umieszczania w warunkach selektywnych po okresie ekspresji.

Przeżywanie: skuteczność kloningu komórek poddanych działaniu substancji, kiedy są umieszczane na koniec okresu poddawania działaniu substancji; przeżywanie zazwyczaj wyrażane jest w odniesieniu do przeżywania populacji komórek kontrolnych.

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Brakujące komórki w kinazie tymidynowej (TK) z powodu mutacji $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ są odporne na skutki cytotoksyczne substancji analogicznej pirymidynie-trifluorotymidynie (TFT). Zdrowe komórki kinazy tymidynowej są wrażliwe na TFT, która powoduje wstrzymanie komórkowej przemiany materii oraz zatrzymuje dalsze dzielenie się komórek. W ten sposób zmutowane komórki są w stanie rozmnażać się wegetatywnie w obecności TFT, podczas gdy normalne komórki, które zawierają kinazę tymidynową, nie są do tego zdolne. Podobnie komórki, którym brakuje HPRT lub XPRT, są wybierane w oparciu o odporność na 6-tioguaninę (TG) lub 8-azaguaninę (AG). Właściwości substancji badanej powinny być ostrożnie wzięte pod uwagę, jeżeli zasadowy element analogiczny lub związek związany z selektywnym czynnikiem jest badany w ramach jakiegokolwiek badania mutacji genów u ssaków. Na przykład jakakolwiek podejrzewana toksyczność selektywna ze strony substancji badanej w odniesieniu do komórek zmutowanych i niezmutowanych powinna zostać zbadana. W ten sposób przeprowadzenie wyboru system/czynnik musi być potwierdzone, badając substancje chemiczne strukturalnie zawiązane z czynnikami selektywnymi (8).

Komórki w zawiesinie lub w hodowli jednocząsteczkowej są poddawane działaniu substancji badanej, zarówno z aktywacją, jak i bez aktywacji metabolicznej, przez odpowiedni okres oraz hodowane wtórnie w celu oznaczenia cytotoksyczności oraz w celu dopuszczenia do ekspresji fenotypowej przed wybraniem mutanta (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoksyczność jest zazwyczaj oznaczana przez pomiar odpowiedniej skuteczności kloningu (przeżywania) lub odpowiedni wzrost hodowli ogółem po okresie poddania działaniu substancji badanej. Hodowle, które zostały poddane działaniu substancji badanej są utrzymywane w podłożu wzrostu przez wystarczający okres czasu, charakterystyczny dla każdego wybranego locus oraz rodzaju komórki, w celu dopuszczenia do prawie optymalnej ekspresji fenotypowej wywołanych mutacji. Częstotliwość mutacji jest oznaczana przez osadzanie znanej ilości komórek w podłożu zawierającym czynnik selektywny w celu wykrycia zmutowanych komórek oraz w podłożu bez czynnika selektywnego w celu oznaczenia skuteczności kloningu (zdolność do życia). Po odpowiednim okresie inkubacji, hodowle są podliczane. Częstotliwość mutacji jest uzyskiwana z ilości hodowli mutantów w selektywnym podłożu oraz ilości hodowli w podłożu nieselektywnym.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Preparaty**

1.4.1.1. *Komórki*

Różnorodność rodzajów komórek jest dostępna do wykorzystania w tym badaniu, łącznie z subklonami L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 lub komórek TK6. Rodzaje komórek wykorzystane w tym badaniu powinny posiadać wykazaną czułość na mutanty chemiczne, wysoką skuteczność kloningu oraz stabilną częstotliwość spontanicznej mutacji. Komórki powinny być sprawdzone w odniesieniu do zanieczyszczenia mykoplazmy oraz w przypadku zanieczyszczenia nie powinny być wykorzystywane.

Badanie powinno być tak opracowane, aby miało wcześniej oznaczoną czułość. Liczba wykorzystanych komórek, hodowli oraz stężeń substancji badanej powinna odzwierciedlać te określone parametry (14). Minimalna liczba zdolnych do życia komórek, które przeżywają poddanie działaniu substancji oraz wykorzystywanych na każdym etapie w badaniu powinna być oparta na częstotliwości mutacji spontanicznej. Ogólną wskazówką jest wykorzystanie liczby komórek, która jest przynajmniej 10-krotnością odwrotności częstotliwości mutacji spontanicznej. Jednakże zaleca się wykorzystanie przynajmniej 106 komórek. Odpowiednie dane historyczne dotyczące wykorzystanego systemu komórkowego powinny być dostępne w celu wskazania spójnego sposobu przeprowadzenia badania.

1.4.1.2. *Warunki dotyczące podłoża oraz hodowli*

Odpowiednie podłoże hodowli oraz warunki inkubacji (naczynia do hodowli, temperatura, stężenie CO_2 oraz wilgotność) powinny być wykorzystane. Podłoże powinno zostać wybrane według systemu selektywnego oraz wykorzystanego rodzaju komórek w badaniu. Jest w szczególności ważne, aby zostały wybrane warunki hodowli, które zapewniają optymalny wzrost komórek w trakcie okresu ekspresji oraz zdolności do formowania kolonii zarówno komórek zmutowanych, jak i niezmutowanych.

1.4.1.3. *Przygotowanie hodowli*

Komórki są rozmnażane z hodowli podstawowych, osadzonych w podłożu hodowli oraz inkubowanych w temperaturze 37 °C. Przed wykorzystaniem w tym badaniu, może istnieć potrzeba oczyszczenia hodowli z istniejących już wcześniej komórek zmutowanych.

1.4.1.4. *Aktywacja metaboliczna*

Komórki powinny zostać poddane działaniu substancji badanej zarówno w obecności, jak i w nieobecności odpowiedniego systemu aktywacji metabolicznej. Najbardziej powszechnie wykorzystywanym systemem jest uzupełniana współczynnikiem frakcja pomitochondrialna (S9) przygotowana z wątroby gryzoni, otrzymujących czynniki pobudzające enzymy takie jak Aroklor 1254 (15) (16) (17) (18) lub kombinacja fenobarbitonu oraz β nafoflavonu (19) (20).

Frakcja pomitochondrialna jest zazwyczaj wykorzystywana w stężeniach w zakresie 1-10 % objętościowo w końcowym podłożu badawczym. Wybór oraz warunki systemu aktywacji metabolicznej mogą być uzależnione od klasy badanej substancji chemicznej. W niektórych przypadkach właściwe może być wykorzystanie więcej niż jednego stężenia frakcji pomitochondrialnej.

Ilość rozwijania się komórek, w tym budowa genetycznie skonstruowanych linii komórkowych stanowiących ekspresję szczególnych enzymów aktywujących, może przewidywać potencjał aktywacji endogenicznej. Wybór wykorzystywanych linii komórkowych powinien być naukowo uzasadniony (np. przez relewancję izoenzymu cytochromu P450 dla przemiany materii substancji badanej).

1.4.1.5. *Preparat substancji badanej*

Stałe substancje badane powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli jest to odpowiednie, zanim komórki zostaną poddane działaniu substancji badanej. Płynne substancje badane mogą być dodawane bezpośrednio do systemu badawczego i/lub rozcieńczane przed poddaniem działaniu substancji badanej. Powinny zostać wykorzystane świeże preparaty, chyba że dane dotyczące stabilności wykazują dopuszczalność ich składowania.

1.4.2. **Warunki badania**

1.4.2.1. *Rozpuszczalnik/nośnik*

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien mieć możliwości reagowania chemicznego z substancją badaną oraz powinien być zgodny z przeżywaniem komórek oraz aktywnością S9. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników. Badając substancje niestabilne w wodzie, wykorzystane organiczne rozpuszczalniki powinny być wolne od wody. Woda może zostać usunięta przez dodanie sita cząsteczkowego.

1.4.2.2. *Stężenia poddania działaniu substancji*

Wśród kryteriów, które mają zostać uwzględnione oznaczając najwyższe stężenia znajduje się cytotoksyczność, rozpuszczalność w systemie badawczym, oraz zmiany pH lub osmolalności.

Cytotoksyczność powinna być oznaczana z aktywacją metaboliczną oraz bez aktywacji metabolicznej w głównym doświadczeniu, wykorzystując odpowiednie wskazanie integralności komórki oraz wzrostu, takie jak odpowiedni kloning (przeżywanie) lub odpowiedni wzrost całkowity. Użyteczne może być oznaczenie cytotoksyczności oraz rozpuszczalności w doświadczeniu wstępnym.

Powinny zostać wykorzystane przynajmniej cztery nadające się do analizy stężenia. W przypadku gdy istnieje cytotoksyczność, stężenia te powinny obejmować zakres od maksymalnej do minimalnej toksyczności lub jej braku, będzie to zazwyczaj oznaczać, że poziomy stężenia powinny zostać oddzielone przez nie więcej niż jeden czynnik między 2 a $\sqrt{10}$. Jeżeli maksymalne stężenie jest oparte na cytotoksyczności, wynikiem tego powinien być wzrost w przybliżeniu 10-20 % (ale nie mniejszy niż 10 %) względnego przeżywania (względna skuteczność kloningu) lub względny wzrost. W odniesieniu do względnie nietoksycznych substancji, maksymalne stężenie badania powinno wynosić 5 mg/ml, 5 µl/ml, lub 1,01 M, w zależności od tego, które ze stężeń jest najniższe.

Względnie nierozpuszczalne substancje powinny być badane do granic ich rozpuszczalności lub poza granice rozpuszczalności w warunkach hodowli. Dowody na nierozpuszczalność powinny być oznaczane w końcowym podłożu podania substancji, działaniu której komórki są poddawane. Użyteczna może być ocena rozpuszczalności na początku oraz na końcu podawania substancji, ze względu na to, że rozpuszczalność może się zmieniać w czasie trwania poddania działaniu substancji w systemie badawczym w wyniku obecności komórek, S9, surowicy itd. Nierozpuszczalność może być wykryta przez wykorzystanie oka nieuzbrojonego. Strącanie się nie powinno zakłócać oceny.

1.4.2.3. *Kontrole*

Równoległe pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik lub nośnik) kontrole, zarówno z aktywacją metaboliczną jak i bez aktywacji metabolicznej powinny zostać objęte każdym doświadczeniem. Jeżeli wykorzystywana jest aktywacja metaboliczna, pozytywna kontrolna substancja chemiczna powinna być substancją, która wymaga aktywacji w celu wywołania reakcji mutagennej.

Przykłady pozytywnych substancji kontrolnych obejmują:

Warunki aktywacji metabolicznej	Locus	Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
Brak egzogenicznej aktywacji metabolicznej	HPRT	Etyl metanosulfonowy	62–50–0	200–536–7
		Etyl nitrozomocznikowy	759–73–9	212–072–2
	TK (małe i duże hodowle)	Metyl metanosulfonowy	66–27–3	200–625–0
	XPRT	Etyl metanosulfonowy	62–50–0	200–536–7
		Etyl nitrozomocznikowy	759–73–9	212–072–2
Obecność egzogenicznej aktywacji metabolicznej	HPRT	3-Metylocholantren	56–49–5	200–276–4
		N-Nitrosodimethylamine	62–75–9	200–549–8
		7,12-antracen dimetylobenzenu	57–97–6	200–359–5
	TK (małe i duże hodowle)	Cyklofosfamid	50–18–0	200–015–4
		Cyklofosfamidomono-hydrat	6055–19–2	
		Benzo[a]piren	50–32–8	200–028–5
		3-Metylocholantren	56–49–5	200–276–5
	XPRT	N-Nitrozodometyloamina (dla wysokich poziomów S-9)	62–75–9	200–549–8
		Benzo[a]piren	50–32–8	200–028–5

Mogą zostać wykorzystane inne odpowiednie wzorcowe pozytywne substancje kontrolne, np. jeśli laboratorium posiada dane historyczne w oparciu o 5-bromo 2'-deoksyurydynę (nr CAS 59–14–3, nr Einecs 200–415–9), ta substancja wzorcowa mogłaby zostać również wykorzystana. Powinno zostać uwzględnione wykorzystanie pozytywnych substancji kontrolnych związanych z klasą substancji chemicznych, jeżeli są dostępne.

Powinny zostać objęte badaniem negatywne kontrole, składające się z samego rozpuszczalnika lub nośnika w podłożu, do którego dodawana jest substancja, oraz w odniesieniu do których stosuje się identyczne działania jak w odniesieniu do grupy poddanej działaniu substancji badanej. Dodatkowo kontrole bez poddania działaniu substancji powinny być również wykorzystane, chyba że istnieją historyczne dane dotyczące kontroli wykazujące, że wybrany rozpuszczalnik nie wywołuje żadnych szkodliwych lub mutagennych skutków.

1.4.3. **Procedura**

1.4.3.1. *Poddawanie działaniu substancji badanej*

Rozmnażające się komórki powinny zostać poddane działaniu substancji badanej zarówno z aktywacją metaboliczną, jak i bez aktywacji metabolicznej. Poddanie działaniu substancji powinno trwać odpowiedni okres czasu (zazwyczaj skuteczny jest okres 3-6 godzin). Czas poddania działaniu substancji badanej może zostać przedłużony, na okres jednego lub większej liczby cykli komórkowych.

Albo komórki poddawane pojedynczo działaniu substancji albo poddawane podwojonemu działaniu substancji badanej mogą być wykorzystane przy każdym badanym stężeniu. Jeżeli wykorzystywane są pojedyncze hodowle, ilość stężeń powinna zostać zwiększona w celu zapewnienia odpowiedniej ilości hodowli do analizy (np. przynajmniej osiem stężeń nadających się do analizy). Powinny zostać wykorzystane podwojone negatywne (rozpuszczalnik) hodowle kontrolne.

Gazowe lub lotne substancje powinny być badane odpowiednimi metodami, takimi jak w szczelnie zamkniętych naczyniach do hodowli (21) (22).

1.4.3.2. *Pomiar przeżywania, zdolności do życia oraz częstotliwości mutacji*

Na koniec okresu poddawania działaniu substancji, komórki są wymywane oraz hodowane w celu oznaczenia przeżywania oraz w celu umożliwienia ekspresji genotypowej mutanta. Pomiar cytotoksyczności przez oznaczanie względnej skuteczności kloningu (przeżywanie) lub względny wzrost całkowity zazwyczaj rozpoczyna się po okresie poddawania działaniu substancji.

Każdy locus posiada określony wymóg w celu dopuszczania do prawie optymalnej ekspresji fenotypowej nowo powstałych mutantów (HPRT oraz XPRT wymaga przynajmniej 6-8 dni, a TK przynajmniej 2 dni). Komórki są hodowane w podłożu z czynnikami selektywnymi lub bez czynników selektywnych w odniesieniu do oznaczania ilości mutantów oraz wydajności klonowania, odpowiednio. Pomiary zdolności do życia (wykorzystywane do obliczania częstotliwości mutacji) rozpoczynane są na koniec okresu ekspresji przez umieszczanie w nieselektywnym podłożu.

Jeżeli substancja badana jest pozytywna w badaniu L5178Y $TK^{+/-}$, powinno zostać przeprowadzone sortowanie według rozmiarów na przynajmniej jednej z badanych kolonii (najwyższe pozytywne stężenie) oraz na pozytywnych i negatywnych kontrolach. Jeżeli substancja badana jest negatywna w badaniu L5178Y $TK^{+/-}$, powinno zostać przeprowadzone sortowanie według rozmiarów na negatywnych i pozytywnych kontrolach. W badaniach wykorzystujących TK6$TK^{+/-}$, może być również przeprowadzone sortowanie według rozmiarów kolonii.

2. DANE

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Dane powinny obejmować oznaczenie cytotoksyczności oraz zdolności do życia, liczbę koloni oraz częstotliwości mutacji w odniesieniu do hodowli, które zostały poddane działaniu substancji oraz hodowli kontrolnych. W przypadku pozytywnej reakcji w badaniu L5178Y $TK^{+/-}$, kolonie są oceniane wykorzystując kryteria małych oraz dużych kolonii na przynajmniej jednym stężeniu substancji badanej (najwyższe pozytywne stężenie) oraz na pozytywnych i negatywnych kontrolach. Charakter cytogenetyczny oraz charakter budowy cząsteczkowej mutantów zarówno małych jak i dużych kolonii został szczegółowo zbadany (23) (24). W badaniu $TK^{+/-}$ kolonie są oceniane wykorzystując kryteria normalnego wzrostu (duże) oraz wolnego wzrostu (małe) koloni (25). Zmutowane komórki, które najbardziej dotkliwie odczuły uszkodzenie genetyczne, przedłużyły podwajanie okresów, a zatem tworzą małe kolonie. Uszkodzenie to zazwyczaj waha się w zakresie od strat całego genu do kariotypów widocznych aberracji chromosomowych. Wprowadzenie mutantów małych kolonii zostało powiązane z substancjami chemicznymi, które wywołują całkowite aberracje chromosomowe (26). Mniej poważnie dotknięte zmutowane komórki wzrastają w zakresie podobnym do komórek macierzystych oraz tworzą duże kolonie.

Powinno zostać podane przeżywanie (względna skuteczność kloningu) lub względny wzrost całkowity. Częstotliwość mutacji powinna być wyrażona jako liczba komórek mutantów przypadających na liczbę komórek przeżywających.

Powinny zostać dostarczone dane dotyczące poszczególnych hodowli. Dodatkowo wszelkie dane powinny zostać podsumowane w formie tabelarycznej.

Nie istnieje wymóg sprawdzania jasnej reakcji pozytywnej. Niejednoznaczne wyniki powinny zostać wyjaśnione przede wszystkim wykorzystując modyfikacje warunków doświadczalnych. Wyniki negatywne muszą zostać potwierdzone na zasadzie jednostkowych przypadków. W przypadkach gdy potwierdzenie negatywnych wyników nie jest uznawane za niezbędne, powinno zostać zapewnione uzasadnienie. Modyfikacje parametrów badawczych w celu rozszerzenia zakresu ocenianych warunków powinno być rozważone w dalszych doświadczeniach w odniesieniu do niejednoznacznych lub negatywnych wyników. Parametry badawcze, które mogą zostać zmodyfikowane obejmują zakres stężeń oraz warunki aktywacji metabolicznej.

2.2. OCENA I INTERPRETACJA WYNIKÓW

Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany z dawką wzrost lub wzrost odtwarzalności częstotliwości mutacji. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Metody statystyczne mogą zostać wykorzystane jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (24). Znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej.

Substancja badana, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w tym systemie.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawała jasne pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie wykluczał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności substancji badanej. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od liczby powtórzeń doświadczenia.

Wyniki pozytywne z badania mutacji genetycznej u ssaków wskazują, że substancja badana wywołuje mutacje genowe w hodowanych komórkach. Największe znaczenie ma reakcja pozytywna stężenia. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych, substancja badana nie wywołuje mutacji genetycznych w wykorzystanych hodowanych komórkach ssaków.

3. SPRAWOZDAWCZOŚĆ

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi obejmować następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru rozpuszczlnika/nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku/nośniku, jeżeli jest znana.

Komórki:

— rodzaj oraz źródło komórek,

— liczba hodowli komórek,

— liczba przejść komórek, jeżeli ma zastosowanie,

— metody utrzymania hodowli komórek, jeżeli mają zastosowanie,

— brak mykoplazmy.

Warunki badania:

— racjonalne uzasadnienie wyboru stężeń oraz liczby hodowli, w tym np. dane dotyczące cytotoksyczności oraz ograniczeń rozpuszczalności, jeżeli są dostępne,

— stężenie CO_2,

— stężenie substancji badanej,

— objętość nośnika oraz dodanej substancji,

— temperatura inkubacji,

— czas inkubacji,

— czas trwania poddania działaniu substancji,

— gęstość komórki w czasie poddania działaniu substancji,

— rodzaj oraz skład systemu aktywacji metabolicznej, w tym kryteria dopuszczalności,

— pozytywne i negatywne kontrole,

— długość okresu ekspresji (w tym liczba sadzonych komórek oraz podhodowli i harmonogramy karmienia, jeżeli stosowne),

— czynniki selektywne,

— kryteria uznania badania za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne,

— metody wykorzystywane do wyliczenia liczby zdolnych do życia oraz zmutowanych komórek,

— definicja kolonii, których rozmiary oraz typy są brane pod uwagę (łącznie z kryteriami w odniesieniu do »małych« oraz »dużych« kolonii, gdzie stosowne).

Wyniki:

— oznaki toksyczności,

— oznaki strącania,

— dane dotyczące pH oraz osmolalności w trakcie poddania działaniu substancji badanej, jeżeli jest oznaczona,

— rozmiar kolonii/hodowli, jeżeli jest oceniony, przynajmniej w odniesieniu do negatywnych oraz pozytywnych kontroli,

— dokładność laboratoryjna mająca na celu wykrycie mutantów małych kolonii/hodowli z systemem L5178Y $TK^{+/-}$, gdzie stosowne,

— relacja miedzy dawką a reakcją, w miarę możliwości,

— analizy statystyczne, jeżeli istnieją,

— dane dotyczące równoległych negatywnych (rozpuszczalniki/nośnik) oraz pozytywnych kontroli,

— historyczne negatywne (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywne dane z zakresami, odchyleniami średnimi oraz standardowymi,

— częstotliwość mutacji.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **ODNIESIENIA**

(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, w: 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, w: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambirdge University Press, pp. 66-101.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZAŁĄCZNIK 4F

„B.23. BADANIE ABERRACJI CHROMOSOMOWEJ SPERMATOGONIÓW U SSAKÓW

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 483, badania aberracji chromosomowej spermatogoniów u ssaków (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Celem badania aberracji chromosomowej spermatogoniów u ssaków *in vivo* jest zidentyfikowanie substancji, które powodują strukturalne aberracje chromosomowe w spermatogoniach ssaków (1) (2) (3) (4) (5). Strukturalne aberracje mogą występować w dwóch typach, chromosomowym lub chromatydowym.. W przypadku mutagenów chemicznych większość wywołanych aberracji jest typu chromatydowego, ale mogą pojawiać się aberracje typu chromosomowego. Metoda ta jest przeznaczona do pomiaru aberracji liczbowych oraz nie jest rutynowo wykorzystywana do tego celu. Mutacje chromosomowe oraz powiązane z nimi zdarzenia są przyczyną wielu ludzkich chorób genetycznych.

Badanie to dokonuje pomiaru zdarzeń chromosomowych w komórkach zarodków oraz z tego względu podejrzewa się, iż przewiduje wprowadzenie dziedzicznych mutacji w komórkach zarodków.

Zazwyczaj w tym badaniu wykorzystywane są gryzonie. Niniejsze badanie cytogenetyczne *in vivo* wykrywa aberracje chromosomowe podczas mitotycznego podziału spermatogoniów. Niniejsze badanie cytogenetyczne *in vivo* wykrywa aberracje chromosomowe podczas mitotycznego podziału spermatogoniów. Inne komórki docelowe nie podlegają tej metodzie.

W celu wykrycia aberracji typu chromatydowego w spermatogoniach, pierwszy podział komórki mitotycznej następujący po poddaniu działaniu substancji powinien zostać zbadany zanim te zmiany patologiczne są zgubione w toku dalszych podziałów komórkowych. Dalsze informacje ze spermatogoniów macierzystych mogą być uzyskane w drodze mejotycznej analizy w odniesieniu do aberracji typu chromosomowego w metafazie diakinezy, jeżeli komórki poddane działaniu substancji stają się spermatocytami.

Niniejsze badanie *in vivo* przeznaczone jest do zbadania, czy mutageny komórek somatycznych są również czynne w komórkach zarodników. Dodatkowo badanie spermatogoniów jest właściwe do celów oceny zagrożenia mutagenności, w związku z czym pozwala na uwzględnienie czynników metabolizmu *in vivo*, farmakokinetyków oraz procesów naprawy DNA.

Pewna ilość generacji spermatogoniów jest obecna w badaniu z widmem czułości na przetwarzanie chemiczne. Zatem wykryte aberracje przedstawiają zagregowaną reakcję poddanych działaniu substancji populacji spermatogoniów z większą ilością zróżnicowanych spermatogoniów przeważających. W zależności od ich pozycji w jądrze, różne generacje spermatogoniów mogą być narażone na ogólny obieg, ze względu na barierę komórek Sertoli oraz barierę krew — jądro.

Jeżeli istnieją dowody na to, że substancja lub odpowiedni metabolit oddziałujący nie dotrze do komórki docelowej, właściwe jest wykorzystanie tego badania.

Patrz także: Ogólne wprowadzenie do Części B.

1.2. DEFINICJE

Aberracja typu chromatydowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu, wyrażone jako pękanie pojedynczych chromatydów lub pękanie oraz ponowne łączenie między chromatydami.

Aberracja typu chromosomowego: strukturalne uszkodzenie chromosomu, wyrażone jako pękanie pojedynczych chromatydów lub pękanie oraz ponowne łączenie obu chromatydów w identycznej lokalizacji.

Szczelina: achromatyczne uszkodzenie mniejsze niż szerokość chromatydu, powodujące minimalne wypaczeniu chromatydu.

Aberracja liczbowa: zmiana w liczbie chromosomów w odniesieniu do normalnej liczby charakterystycznej dla wykorzystywanych komórek.

Poliploidalność: wielokrotność liczby chromosomów haploidalnych (n) inna niż liczba diploidalna (np. 3 *n*, 4 *n* itd.).

Aberracja strukturalna: zmiana w strukturze chromosomu, wykrywalna przez badanie mikroskopowe etapu metafazy podziału komórek, zaobserwowana jako usunięcia oraz fragmenty, zmiany (zachodzące — wewnątrz oraz między chromosomami).

1.3. ZASADA METODY BADAWCZEJ

Zwierzęta są poddane działaniu substancji badanej odpowiednią drogą poddania działaniu substancji oraz są uśmiercane w odpowiednim czasie po poddaniu ich działaniu substancji badanej. Przed uśmierceniem, zwierzęta są poddawane działaniu substancji zatrzymującej metafazę (np. kolchicyna lub Colcemid®). Preparaty chromosomowe są sporządzane z komórek zarodników oraz barwione, a komórki metafazy są analizowane pod kątem aberracji chromosomowych.

1.4. OPIS METODY BADAWCZEJ

1.4.1. **Preparaty**

1.4.1.1. *Wybór gatunków zwierząt*

Powszechnie wykorzystywane są samce chomika chińskiego oraz myszy. Jednakże, mogą być wykorzystane w badaniu samce innych odpowiednich gatunków saków. Powszechnie wykorzystywane szczepy laboratoryjne młodych, zdrowych dojrzałych zwierząt powinny zostać wykorzystane. W trakcie przeprowadzania badania, różnice w masie ciała zwierząt powinny być minimalne oraz nie powinny przekraczać ± 20 % średniej masy.

1.4.1.2. *Warunki przetrzymywania i karmienia*

Ogólne warunki określone w Ogólnym wprowadzeniu do Części B są stosowane, chociaż celem w odniesieniu do wilgotności powinien być poziom 50-60 %.

1.4.1.3. *Preparaty zwierzęce*

Zdrowe, młode dojrzałe samce są losowo przypisywane do grup kontrolnych oraz grup poddawanych działaniu substancji badanej. Klatki powinny być urządzone w taki sposób, aby możliwe skutki negatywne wynikające z umieszczenia w klatce były zminimalizowane. Zwierzęta są identyfikowane w niepowtarzalny sposób. Zwierzęta są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przez przynajmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania.

1.4.1.4. *Przygotowanie dawek*

Substancje badane stałe powinny zostać rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczone, jeżeli stosowne, przed dawkowaniem zwierzętom. Substancje badane płynne mogą być dawkowane bezpośrednio lub mogą zostać rozpuszczone przed dawkowaniem. Powinny zostać wykorzystane świeżo przygotowywane substancje, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują iż dopuszczalne jest składowanie substancji.

1.4.2. **Warunki badawcze**

1.4.2.1 *Rozpuszczalnik/nośnik*

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać skutków toksycznych przy wykorzystywanych dawkach oraz nie powinien mieć możliwości reagowania chemicznego z substancją badaną. Jeśli wykorzystywane są inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

1.4.2.2. *Kontrole*

Równoległe pozytywne i negatywne (rozpuszczalnik/nośnik) kontrole, powinny zostać objęte każdym badaniem. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być przedmiotem identycznych działań w porównaniu ze zwierzętami w grupie poddanej działaniu substancji.

Kontrole pozytywne powinny wywoływać strukturalne aberracje w spermatogoniach, jeżeli są podawane na poziomie poddania działaniu substancji, w odniesieniu do którego oczekuje się wykrywalnego wzrostu powyżej tło.

Dawki kontroli pozytywnych powinny zostać dobrane tak, aby wyniki były jasne, ale nie ujawniały bezpośrednio tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych badającemu. Dopuszczalne jest, aby pozytywne kontrole podawane były inną drogą niż substancje badane oraz, aby ich próbki pobierane były tylko

jeden raz. Wykorzystanie substancji chemicznych kontroli pozytywnych powiązanych z klasą chemiczną może być brane pod uwagę, jeżeli są one dostępne. Przykłady substancji pozytywnych kontroli obejmują:

Substancja	Nr CAS	Nr Einecs
cyklofosfamid cyklophosfamid monohydrat	50–18–0 6055–19–2	200–015–4
cykloheksyloamina	108–91–8	203–629–0
mitomycyna C	50–07–7	200–008–6
krylamid monomeryczny	79–06–1	201–173–7
trietylenomelamina	51–18–3	200–083–5

Negatywne kontrole składające się z samego rozpuszczalnika lub nośnika bez substancji badanej oraz w innych przypadkach poddane działaniu substancji w ten sam sposób jak grupy poddane działaniu substancji powinny zostać objęte kontrolą. Dodatkowo, kontrole bez poddania działaniu substancji powinny być również wykorzystywane, chyba że istnieją historyczne dane dotyczące kontroli wykazujące, że brak szkodliwych lub mutagennych skutków wywoływanych wybranym rozpuszczalnikiem. Negatywne kontrole, poddane działaniu rozpuszczalnika lub nośnika oraz w innym przypadku poddane działaniu w ten sam sposób, co grupy poddane działaniu substancji(powinny zostać objęte badaniem w odniesieniu do każdego pobierania próbek, chyba że dopuszczalna jest wewnątrz zwierzęca zdolność do życia oraz częstotliwości komórek z aberracjami chromosomowymi są wykazane przez dane historyczne. Dodatkowo, powinny zostać również wykorzystane kontrole bez poddawania działaniu substancji, chyba że istnieją historyczne lub opublikowane dane wykazujące, że przez wybrany rozpuszczalnik/nośnik nie są wywoływane żadne szkodliwe lub mutagenne skutki.

1.5. PROCEDURA

1.5. **Liczba zwierząt**

Każda grupa poddana działaniu substancji oraz grupa kontrolna musi obejmować przynajmniej pięć nadających się do analizy samców.

1.5.2. **Harmonogram poddania działaniu substancji**

Substancje badane są zazwyczaj podawane raz lub dwa razy (np. jako pojedyncza dawka lub jako dwa zabiegi poddawania działaniu substancji). Substancje badane mogą być również podawane jako dawka podzielona, np. dwa zabiegi poddania działaniu substancji tego samego dnia w odstępie czasu nie większym niż kilka godzin, w celu ułatwienia podawania dużych objętości substancji. Inne reżimy dawki powinny być naukowo uzasadnione.

W grupie najwyższej dawki, wykorzystywane są dwa okresy pobierania próbek po poddaniu działaniu substancji badanej. Ze względu na to, że na kinetykę komórkową może mieć wpływ substancja badana, wykorzystywany jest jeden wczesny oraz jeden późny okres pobierania próbek w około 24-48 godzin po poddaniu działania substancji badanej odniesieniu do dawek innych niż dawka najwyższa, powinien zostać uwzględniony 24-godzinny okres pobierania próbek lub 1,5 długości trwania cyklu komórkowego, chyba że w odniesieniu do innych okresów pobierania próbek uważa się, iż są one odpowiednie dla wykrycia skutków (6).

Dodatkowo, mogą zostać wykorzystane inne okresy pobierania próbek. Na przykład, w przypadku substancji chemicznych, które mogą wywoływać aberracje opóźnione lub mogą wywierać skutki niezależne od S, odpowiednie mogą być wcześniejsze okresy pobierania próbek. (1).

Odpowiedniość powtarzanych harmonogramów poddawania działaniu substancji musi zostać zidentyfikowana na zasadzie jednostkowych przypadków. Po powtarzanym zabiegu — poddania działaniu substancji zwierzę powinno następnie zostać uśmiercone w 24 godziny (1,5 długości cyklu komórkowego) po ostatnim zabiegu poddania działaniu substancji. Dodatkowe okresy pobierania próbek mogą zostać wykorzystane w przypadku gdy jest to stosowne.

Przed uśmierceniem zwierzętom wstrzykuje się wewnątrzotrzewnowo odpowiednią dawkę substancji zatrzymującej metafazę (np. Colcemid® lub kolchicynę). Następnie pobiera się próbkę ze zwierząt w odpowiednich odstępach czasu. W odniesieniu do myszy ten odstęp czasu wynosi 3-5 godzin, w odniesieniu do chomików chińskich ten odstęp czasu wynosi w przybliżeniu 4-5 godzin.

1.5.3. **Poziomy dawek**

Jeżeli przeprowadzane jest badanie ustalające dawkę, ponieważ nie istnieją dostępne odpowiednie dane, powinno zostać ono przeprowadzone w tym samym laboratorium, wykorzystując ten sam reżim gatunku, szczepu oraz poddania działaniu substancji, który ma zostać wykorzystany w badaniu głównym. (7). Jeżeli istnieje toksyczność, wykorzystywane są trzy poziomy dawek w odniesieniu do pierwszego okresu pobierania próbek. Te poziomy dawek powinny obejmować zakres od maksymalnej do małej toksyczności lub do jej braku. W czasie późniejszego okresu pobierania próbek muszą zostać wykorzystane jedynie najwyższe dawki. Najwyższa dawka określana jest jako dawka wywołująca oznaki toksyczności, tak że wyższe dawki oparte na tym samym reżimie dawkowania mogłyby wywołać śmiertelność.

Substancje o szczególnej aktywności biologicznej przy niskotoksycznych dawkach (takie jak hormony oraz mitogeny) mogą stanowić wyjątki w odniesieniu do kryteriów ustalania dawek oraz powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków. Najwyższa dawka może być również określona jako dawka wytwarzająca niektóre wskazania toksyczności w spermatogoniach (np. zmniejszenie wskaźnika mitotycznego podziału spermatogoniów do pierwszej oraz drugiej fazy mejotycznej; redukcja ta nie powinna przekroczyć 50 %).

1.5.4. **Badanie ograniczone**

Jeżeli badanie w oparciu o jeden poziom dawek w odniesieniu do zwierząt o przynajmniej 2 000 mg/kg masy ciała, wykorzystujące pojedyncze poddanie działaniu substancji lub dwa zabiegi poddania działaniu substancji tego samego dnia, nie daje dostrzegalnych skutków toksycznych, oraz jeżeli nie podejrzewa się genotoksyczności w oparciu o dane dotyczące substancji powiązanych strukturalnie, wówczas przeprowadzenie pełnego badania może nie być konieczne. Spodziewane poddanie człowieka działaniu substancji może wykazać potrzebę wykorzystania większej dawki w badaniu ograniczonym.

1.5.5. **Dawkowanie**

Badana substancja jest zazwyczaj podawana przez zgłębnik żołądkowy lub odpowiednią rurkę intubacyjną, lub przez wstrzyknięcie wewnątrzotrzewnowe. Mogą być dopuszczalne inne drogi poddania działaniu substancji w przypadku gdy mogą być uzasadnione. Maksymalna objętość płynu, jaka może być podana przez zgłębnik lub wstrzyknięcie jednorazowo zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 2 ml/100 kg masy ciała. Wykorzystanie pojemności wyższych niż te, musi być uzasadnione. Z wyjątkiem substancji podrażniających lub żrących, które będą w normalnych warunkach ujawniać pogorszone skutki z większymi stężeniami, zmienność w badanej objętości powinna zostać zminimalizowana przez dostosowanie stężenia w celu zapewnienia stałej objętości przy wszystkich poziomach dawek.

1.5.6. **Przygotowanie chromosomów**

Bezpośrednio po uśmierceniu zawiesiny komórkowe uzyskiwane są z jednego lub obu badań, poddanego działaniu roztworu hipotonicznego oraz stabilizowane Następnie komórki są rozprowadzane na szkiełkach mikroskopowych oraz barwione.

1.5.7. **Analiza**

W odniesieniu do każdego zwierzęcia powinno zostać poddane analizie przynajmniej 100 dobrze rozprowadzonych metafaz (np. minimum 500 metafaz na grupę). Liczba ta może zostać zmniejszona, jeżeli zaobserwowane są duże liczby aberracji. Wszystkie szkiełka mikroskopowe, włącznie z tymi z pozytywnych i negatywnych kontroli, powinny być niezależnie kodowane przed przeprowadzeniem analizy mikroskopowej. Ze względu na to, że skutkiem procedur stabilizacji często jest zerwanie proporcji udziału metafaz ze stratą chromosomów, komórki oceniane powinny zawierać liczbę centromerów równą 2n ± 2.

2. **DANE**

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Dane dotyczące poszczególnych zwierząt powinny zostać przedstawione w formie tabelarycznej. Jednostką doświadczalną jest zwierzę. W odniesieniu do każdego zwierzęcia liczba komórek z aberracjami chromosomowymi oraz liczba aberracji przypadających na komórkę powinny zostać ocenione. Różne typy strukturalnej aberracji chromosomowej powinny być wymienione wraz z ich ilościami oraz częstotliwościami w odniesieniu do grupy poddanej działaniu substancji oraz grupy kontrolnej. Szczeliny są oddzielnie odnotowywane oraz zgłaszane, ale ogólnie nie są włączane do częstotliwości aberracji ogółem.

Jeżeli obserwuje się zarówno mitozę, jak i mejozę, powinien zostać oznaczony wskaźnik podziału mitotycznego spermatogoniów w odniesieniu do pierwszej i drugiej metafazy majotycznej, jako miara cytotoksyczności dla wszystkich poddanych działaniu substancji oraz zwierząt poddanych kontroli negatywnej w całkowitej próbce 100 dzielących się komórek na zwierzę, w celu ustalenia możliwego skutku cytotoksycznego. Jeżeli zaobserwowana jest jedynie mitoza, wskaźnik mitozy powinien zostać oznaczony w przynajmniej 1 000 komórek przypadających na zwierzę.

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Istnieją liczne kryteria oznaczania wyników pozytywnych, takie jak związany z dawką wzrost względnej ilości komórek z aberracjami chromosomowymi lub wyraźny wzrost w ilości komórek z aberracjami w pojedynczej dawce przy jednym pobieraniu próbek. Biologiczne znaczenie wyników powinno zostać wzięte pod uwagę w pierwszej kolejności. Metody statystyczne mogą zostać wykorzystane jako metody pomocnicze w przeprowadzaniu oceny wyników (8). Jednakże znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej. Wyniki niejednoznaczne powinny zostać wyjaśnione przez dalsze badanie, w szczególności wykorzystując modyfikację warunków doświadczalnych.

Substancja badana, w odniesieniu do której wyniki nie spełniają powyższych kryteriów, uważana jest za niemutagenną w tym badaniu.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawała w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie wykluczał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności badanej substancji. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od liczby powtórzonych doświadczeń.

Wyniki pozytywne z badania aberracji chromosomowych spermatogoniów *in vivo* wskazują, że substancja badana wywołuje aberracje chromosomowe w komórkach zarodków badanych gatunków. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych substancja badana nie jest mutagenna w badanym gatunku.

Prawdopodobieństwo, że substancja badana lub jej metabolity docierają do tkanki docelowej, powinno zostać omówione.

3. SPRAWOZDAWCZOŚĆ

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku / nośniku, jeżeli jest znana.

Badane zwierzęta:

— wykorzystane gatunki/szczepy,

— liczba oraz wiek zwierząt,

— źródło, warunki przetrzymywania, odżywianie itd.,

— indywidualna masa ciała zwierzęcia na początku badania, w tym zakres masy ciała, średnie oraz standardowe odstępstwa w odniesieniu do każdej z grup.

Warunki badania:

— dane dotyczące studium określającego zakres badania, jeżeli zostało przeprowadzone,

— racjonalne uzasadnienie wyboru poziomu dawek,

— racjonalne uzasadnienie wyboru drogi podawania substancji,

— szczegóły dotyczące substancji badanej,

— szczegóły dotyczące podawania substancji badanej,

— racjonalne uzasadnienie czasów uśmiercania,

— zmiana stężenia substancji badanej w odżywianiu/wodzie pitnej (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg masy ciała/dzień), jeżeli ma zastosowanie,

— szczegóły dotyczące jakości wody oraz żywności,

— szczegółowy opis poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek,

— metody pomiaru toksyczności,

— tożsamość substancji zatrzymującej metafazę, jej stężenie oraz czas trwania poddania działaniu substancji,

— metody przygotowania szkiełek mikroskopowych,

— kryteria w odniesieniu do aberracji oceniających,

— liczba poddanych analizie komórek przypadających na zwierzę,

— kryteria uznawania badania za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

— oznaki toksyczności,

— indeks mitotyczny,

— stosunek podziału mitotycznego spermatogoniów w odniesieniu do pierwszej i drugiej metafazy mejotycznej,

— typ oraz liczba aberracji, podany oddzielnie dla każdego zwierzęcia,

— całkowita liczba aberracji przypadająca na grupę,

— liczba komórek z aberracjami przypadająca na grupę,

— relacja miedzy dawką a reakcją, w miarę możliwości,

— analizy statystyczne, jeżeli istnieją,

— dane dotyczące równoległych kontroli negatywnych,

— dane dotyczące historycznych kontroli negatywnych i pozytywnych, rozpuszczalnik/nośnik), wraz z zakresami, średnimi oraz standardowymi odchyleniami,

— dane dotyczące równoległych kontroli pozytywnych,

— zmiany w poliploidalności, jeżeli je dostrzeżono.

Omówienie wyników.

Wnioski.

4. **ODNIESIENIA**

(1) Adler, I. D., (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications, w: *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, w: *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."

ZAŁĄCZNIK 4G

„B.39. TEST POREPERACYJNEJ SYNTEZY DNA Z KOMÓRKAMI WĄTROBY SSAKÓW *IN VIVO*

1. METODA

Metoda ta jest powtórzeniem OECD TG 486, testu poreperacyjnej syntezy DNA z komórkami wątroby ssaków *in vivo* (1997).

1.1. WPROWADZENIE

Celem testu poreperacyjnej syntezy DNA z komórkami wątroby ssaków *in vivo* (UDS) jest zidentyfikowanie substancji badanych, które wywołują naprawę DNA w komórkach wątroby lub u zwierząt poddanych działaniu substancji (1) (2) (3) (4).

To badanie *in vivo* przewiduje metodę wykrywania skutków genotoksycznych substancji chemicznej w wątrobie. Zmierzony punkt końcowy jest wskaźnikiem uszkodzenia DNA oraz dalszych napraw w komórkach wątroby. Wątroba jest zazwyczaj głównym miejscem, gdzie odbywa się przemiana materii wchłanianych związków. Jest zatem właściwym miejscem pomiarów uszkodzenia DNA *in vivo*.

Jeżeli istnieją dowody na to, że substancja nie dotrze do tkanek docelowych, wykorzystanie tego badania nie jest właściwe.

Punkt końcowy testu poreperacyjnej syntezy DNA z komórkami wątroby ssaków *in vivo* mierzony jest przez oznaczenie poboru oznaczonych nukleozydów w komórkach, które nie są poddawane syntezie białka (faza S). Najpowszechniej wykorzystywaną techniką jest oznaczanie poboru wykorzystanej oznaczonej trytem tymidyny (^{3}H-TdR) przez autoradiografię. Preferuje się wykorzystywanie wątroby szczurów do przeprowadzenia badań *in vivo* UDS. Tkanki inne niż wątrobowe mogą zostać wykorzystane, ale nie podlegają one tej metodzie.

Wykrycie reakcji UDS uzależnione jest od ilości zasad DNA usuniętych i zastąpionych w miejscu uszkodzenia. Z tego względu badanie UDS ma szczególną wartość w odniesieniu do wykrywania wywołanych przez substancję napraw (20-30 zasad). Odwrotnie, »reperacja krótkich fragmentów DNA« (jedna do trzech zasad) jest wykrywana ze znacznie mniejszą czułością. Co więcej, zdarzenia mutagenne mogą wynikać ze względu na nienaprawienie, niewłaściwą naprawę, niewłaściwe zastąpienie defektów DNA. Zakres reakcji UDS nie zawiera wskazania dokładności procesu naprawy. Dodatkowo możliwe jest, że mutagen reaguje z DNA, ale uszkodzenie DNA nie jest naprawione poprzez wycinek procesu naprawczego. Brak szczegółowych informacji dotyczących aktywności mutagennej dostarczonych przez badanie UDS jest wyrównywane przez potencjał wrażliwości tego punktu końcowego, ponieważ jest on mierzony w całym genomie.

Patrz także: Ogólne wprowadzenie do części B.

1.2. DEFINICJE

Komórki w naprawie: względna ilość ziarnistości jądrowych (NNG) wyższa niż aktualna wartość, która ma zostać uzasadniona w laboratorium, w którym przeprowadzane są badania.

Względna ilość ziarnistości jądrowych (NNG): miara ilościowa w odniesieniu do aktywności UDS komórek w testach autoradiograficznych UDS, obliczona przez odejmowanie średniej ilości jąder cytoplazmowych w obszarach cytoplazmowych równoważnych jądru (CG) od ilości ziarnistości jądrowych (NG): NNG = NG – CG. NNG obliczeń dokonuje się dla poszczególnych komórek, a następnie łączy się dla komórek w ramach danej hodowli, w równoległych hodowlach, etc.

Test poreperacyjnej syntezy DNA *(UDS)*: synteza reperacyjna DNA po wycięciu oraz usunięciu części DNA zawierającej region uszkodzenia wywołanego substancjami chemicznymi lub czynnikami fizycznymi.

1.3. ZASAD METODY BADAWCZEJ

Badanie UDS na komórkach wątroby ssaków wskazuje syntezę naprawczą DNA po wycięciu oraz usunięciu odcinka DNA zawierającego region uszkodzenia wywołanego substancjami chemicznymi lub czynnikami fizycznymi. Badanie zazwyczaj opiera się na włączeniu ^{3}H-TdR do DNA komórek wątroby, które posiadają niską częstotliwość komórek w fazie S cyklu komórkowego. Pobór ^{3}H-TdR zazwyczaj jest oznaczany przez auroradiografię, ze względu na to, że ta technika nie jest tak podatna na zakłócenie przez komórki fazy S jak na przykład płynne podliczanie scyntalizacji.

1.4. OPIS METODY

1.4.1. **Preparaty**

1.4.1.1. *Wybór gatunków zwierząt*

Powszechnie wykorzystywane są szczury, chociaż każdy odpowiedni gatunek ssaków może zostać wykorzystany. Powszechnie wykorzystywane szczepy laboratoryjne młodych, zdrowych dojrzałych zwierząt powinny zostać wykorzystane. W trakcie przeprowadzania badania, zmienność masy zwierząt powinno być minimalne oraz nie powinno przekraczać ± 20 % średniej masy dla każdej z płci.

1.4.1.2. *Warunki przetrzymywania oraz karmienia*

Ogólne warunki określone w Ogólnym wprowadzeniu do części B są stosowane, chociaż celem w odniesieniu do wilgotności powinien być poziom 50-60 %.

1.4.1.3. *Przygotowanie zwierząt*

Zdrowe młode dorosłe osobniki zwierząt są losowo przypisane do grup kontrolnych oraz grup poddanych działaniu substancji. Klatki powinny zostać przygotowane w sposób minimalizujący możliwe skutki negatywne wynikające z umieszczenia w klatce. Zwierzęta są identyfikowane oraz aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych przynajmniej przez okres pięciu dni.

1.4.1.4. *Substancja badana/przygotowanie*

Stała substancja badana powinna zostać rozpuszczona lub zawieszona w odpowiednich rozpuszczalnikach lub nośnikach oraz rozcieńczona, jeżeli jest to odpowiednie przed dawkowaniem zwierzętom. Płynne substancje mogą być dawkowane bezpośrednio lub rozcieńczane przed dawkowaniem. Powinny zostać wykorzystane świeżo przygotowywane substancje, chyba że dane dotyczące stabilności wskazują, iż dopuszczalne jest składowanie substancji

1.4.2. **Warunki badania**

1.4.2.1. *Rozpuszczalnik/nośnik*

Rozpuszczalnik/nośnik nie powinien wywoływać skutków toksycznych przy wykorzystanym poziomie dawek oraz w odniesieniu do niego nie powinno być spodziewane reagowanie chemiczne z substancją badaną. Jeśli inne niż dobrze znane rozpuszczalniki/nośniki są wykorzystywane, ich włączenie do doświadczenia powinno być wsparte danymi wskazującymi ich zgodność. Zaleca się, o ile to możliwe, aby w pierwszej kolejności rozważone zostało wykorzystanie wodnych rozpuszczalników/nośników.

1.4.2.2. *Kontrole*

Równoległe pozytywne oraz negatywne kontrole (rozpuszczalnik/nośnik) powinny zostać objęte każdą, niezależnie przeprowadzaną częścią doświadczenia. Z wyjątkiem poddawania działaniu substancji badanej, zwierzęta w grupie kontrolnej powinny być poddawane działaniom w identyczny sposób, jak zwierzęta w grupach poddanych działaniu substancji.

Pozytywnymi kontrolami powinny być substancje znane z wytwarzania UDS, jeżeli są podawane przy poziomie poddania działaniu substancji, w odniesieniu do którego oczekuje się, iż da wykrywalny wzrost powyżej tła. Pozytywne kontrole, potrzebujące aktywacji metabolicznej powinny być wykorzystywane, jeżeli są podawane przy dawkach wywołujących umiarkowane reakcje (4). Dawki mogą zostać wybrane tak, aby skutki były jasne, ale aby nie ujawniały natychmiast badającemu tożsamości zakodowanych szkiełek mikroskopowych. Przykładami pozytywnych substancji kontrolnych są:

Okresy pobierania próbek	Substancje	Nr CAS	Nr Einecs
Wczesne okresy pobierania próbek (2-4 godzin)	N-nitrozodimetyloamina	62–75–9	200–249–8
Późne okresy pobierania próbek (12-16 godzin)	N-2-fluorenyloacetamid (2-AAF)	53–96–3	200–188–6

Inne odpowiednie kontrolne substancje chemiczne mogą zostać wykorzystane. Dopuszczalne jest, by pozytywne kontrole były podawane drogą inną niż substancja badana.

1.5. PROCEDURA

1.5.1. **Liczba oraz płeć zwierząt**

Powinna zostać wykorzystana odpowiednia liczba zwierząt w celu uwzględnienia naturalnej biologicznej zmienności reakcji. Liczba zwierząt powinna przynajmniej stanowić trzy nadające się do poddania analizie osobniki na grupę. W przypadku gdy została zgromadzona znacząca baza danych, jedynie jedno zwierzę lub dwa zwierzęta są wymagane w odniesieniu do równoległych negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych.

Jeżeli w trakcie badania istnieją dostępne dane z badań dotyczących tego samego gatunku, wykorzystując tę samą drogę poddania działaniu substancji, które wskazują że nie istnieją zasadnicze różnice w toksyczności między płciami, badanie jednej płci będzie wystarczające. W przypadku poddawania człowieka działaniu substancji, badanie może być specyficzne co do płci, tak jak na przykład w odniesieniu do niektórych środków farmaceutycznych, badanie powinno zostać przeprowadzone z udziałem zwierząt odpowiedniej płci.

1.5.2. **Harmonogram poddania działaniu substancji**

Substancje badane są w ujęciu ogólnym, podawane jako pojedynczy zabieg poddania działaniu substancji.

1.5.3. **Poziomy dawek**

Zazwyczaj wykorzystywane są przynajmniej dwa poziomy dawek. Najwyższa dawka jest określona jako dawka wywołująca oznaki toksyczności a wyższe poziomy dawek oparte na tym samym reżimie dawkowania mogłyby być zabójcze. Ogólnie niższa dawka powinna wynosić od 50 % do 25 % wysokiej dawki.

Substancje o szczególnej aktywności biologicznej przy niskich nietoksycznych dawkach (takie jak hormony i mitogeny) mogą stanowić wyjątek w odniesieniu do kryteriów ustalania dawki i powinny być oceniane na zasadzie jednostkowych przypadków. Jeżeli przeprowadzane jest studium określające zakres badania, powinno być ono przeprowadzone w tym samym laboratorium, wykorzystując ten sam reżim gatunku, szczepu, płci oraz poddawania działaniu substancji, który ma zostać wykorzystany w badaniu głównym.

Najwyższa dawka może być również określona jako dawka, która wywołuje pewne wskazania toksyczności w wątrobie (np. jądrze piknotycznym).

1.5.4. **Badanie ograniczone**

Jeżeli badanie w oparciu o jeden poziom dawek o przynajmniej 2 000 mg/kg masy ciała zastosowane w pojedynczym poddaniu działaniu substancji, lub jako dwa zabiegi poddania działaniu substancji tego samego dnia, nie daje dostrzegalnych wyników toksycznych, oraz jeżeli nie podejrzewa się genotoksyczności w oparciu o dane dotyczące substancji powiązanych strukturalnie, wówczas przeprowadzenie pełnego badania może nie być konieczne. Spodziewa się, iż poddanie człowieka działaniu substancji może wykazać potrzebę wykorzystania większej dawki w badaniu ograniczonym.

1.5.5. **Dawkowanie**

Substancja badana jest zazwyczaj podawana przez zgłębnik żołądkowy lub odpowiednią rurkę intubacyjną. Inne drogi poddania działaniu substancji mogą być dopuszczalne w przypadku gdy ich wykorzystanie jest uzasadnione. Jednakże droga wewnątrzotrzewnowa nie jest zalecana ze względu na to, że mogłaby poddać wątrobę bezpośrednio działaniu substancji badanej, co jest bardziej prawdopodobne niż w przypadku poddania działaniu substancji przez krwiobieg. Maksymalna objętość płynu, jaka może być podana przez zgłębnik lub wstrzyknięta jednorazowo zależy od wielkości badanego zwierzęcia. Objętość nie powinna przekraczać 2 ml/100g masy ciała. Wykorzystanie objętości wyższych niż te musi być uzasadnione. Z wyjątkiem podrażniających lub żrących substancji, które zazwyczaj ujawniają zwiększone skutki o dużym stężeniu, zmienności w objętości substancji badanej powinny zostać zminimalizowane przez dostosowanie stężenia w celu zapewnienia stałej objętości przy wszystkich poziomach dawek.

1.5.6. **Przygotowanie komórek wątroby**

Komórki wątroby przygotowywane są z poddanych działaniu substancji zwierząt zazwyczaj w 12-16 godzin po dawkowaniu. Dodatkowy wcześniejszy okres pobierania próbek (zazwyczaj dwie do czterech godzin po poddaniu działaniu substancji) jest generalnie niezbędny, chyba że istnieje jasna pozytywna reakcja przy 12-16 godzinach. Jednakże alternatywne okresy pobierania próbek mogą być wykorzystane, jeżeli są uzasadnione na podstawie danych toksykokinetycznych.

Krótkookresowe hodowle komórek wątrobowych ssaków są zazwyczaj ustanawiane przez przecedzanie wątroby *in situ* z kolagenazą i pozwalając na przytwierdzenie świeżo dysocjowanych komórek wątroby do odpowiedniej powierzchni. Komórki wątroby ze zwierząt kontroli negatywnych powinny posiadać zdolność do życia (5) wynoszącą przynajmniej 50 %.

1.5.7. **Oznaczanie UDS**

Świeżo oddzielone komórki wątroby ssaków są inkubowane zazwyczaj w podłożu zawierającym ^{3}H-TdR przez odpowiedni okres czasu, np. trzy do ośmiu godzin. Na koniec okresu inkubacji, podłoże powinno zostać usunięte od komórek, które mogą następnie być inkubowane w podłożu zawierającym nadmiar nieoznaczonej tymidyny w celu zmniejszenia niewłączonej radioaktywności (»zimny obieg«). Następnie komórki są płukane, stabilizowane oraz suszone. W odniesieniu do okresów inkubacji bardziej przedłużonych w czasie zimny obieg może nie być konieczny. Szkiełka mikroskopowe są zanurzane w emulsji autoradiograficznej, poddawane działaniu substancji w ciemności (np. przetrzymywane w lodówce przez 7-14 dni), wytwarzane, barwione, a srebrne ziarna są podliczane. Przygotowywane są dwa lub trzy szkiełka mikroskopowe dla każdego zwierzęcia.

1.5.8. **Analiza**

Preparaty szkiełek mikroskopowych powinny zawierać wystarczającą liczba komórek o normalnej morfologii w celu umożliwienia przeprowadzenia mającej znaczenie oceny UDS. Preparaty są badane mikroskopowo pod kątem oznak jawnej cytotoksyczności (np. pyknoza, zmniejszony poziom oznaczenia radioaktywności).

Szkiełka mikroskopowe powinny być kodowane przed podliczeniem ziaren. Zazwyczaj 100 komórek jest ocenianych z każdego zwierzęcia, z przynajmniej dwu szkiełek mikroskopowych; ocena mniejszej ilości niż 100 komórek/zwierzę powinna zostać uzasadniona. ilości ziaren nie są oceniane punktowo w odniesieniu do S-fazy jądra, ale udział komórek S-fazy może zostać odnotowany.

Ilość włączenia ^{3}H-TdR w jądrze oraz cytoplazmy normalnych pod względem morfologii komórek, jak potwierdzono przez osadzanie się srebrnych ziaren, powinna być oznaczona odpowiednią metodą.

2. **DANE**

2.1. PRZETWARZANIE WYNIKÓW

Powinny zostać dostarczone indywidualne szkiełka mikroskopowe oraz dane dotyczące zwierzęcia. dodatkowo wszystkie dane powinny zostać podsumowane w formie tabelarycznej. Względna ilość ziarnistości jądrowych (NNG) powinna zostać obliczona dla każdej komórki, dla każdego zwierzęcia oraz dla każdej dawki oraz czasu przez odjęcie ilości CG od ilości ziarnistości jądrowych (NG). Jeśli »komórki w naprawie« są podliczane, kryteria oznaczania »komórek w naprawie« powinny zostać uzasadnione oraz oparte na historycznych danych dotyczących kontroli negatywnej lub danych dotyczących równoległej kontroli negatywnej. Wyniki liczbowe mogą być ocenione z wykorzystaniem metod statystycznych. Jeżeli są wykorzystywane, badania statystyczne powinny zostać wybrane oraz uzasadnione przed przeprowadzeniem badania.

2.2. OCENA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

Przykłady kryteriów w odniesieniu do pozytywnych/negatywnych reakcji obejmują:

pozytywne	(i)	Wartości NNG powyżej istniejącego progu, który jest uzasadniony na podstawie historycznych danych laboratoryjnych;
lub	(ii)	Wartości NNG znacząco wyższe w porównaniu z równoległą kontrolą;
negatywne	(i)	Wartości NNG w zakresie poniżej historycznego progu kontrolnego;
lub	(ii)	Wartości NNG nieznacznie wyższe w porównaniu z równoległą kontrolą.

Biologiczne znaczenie danych powinno zostać wzięte pod uwagę, np. parametry takie jak: zmienność międzyzwierzęca, relacja między dawką, a reakcją oraz cytotoksyczność powinny zostać uwzględnione. Metody statystyczne mogą być wykorzystane jako metody pomocnicze w ocenie wyników badania. Jednakże, znaczenie statystyczne nie powinno być jedynym czynnikiem określającym w odniesieniu do reakcji pozytywnej.

Chociaż większość doświadczeń będzie dawało w jasny sposób pozytywne lub negatywne wyniki, w rzadkich przypadkach zestaw danych będzie uniemożliwiał dokonanie ostatecznej oceny dotyczącej aktywności substancji badanej. Wyniki mogą pozostać niejednoznaczne lub sporne niezależnie od tego ile razy doświadczenie było powtarzane.

Wyniki pozytywne z testu UDS z komórkami wątroby ssaków *in vivo* wskazują, że substancja badana wywołuje uszkodzenia DNA w komórkach wątroby ssaków *in vivo*, które mogą zostać naprawione w drodze testu poreperacyjnej syntezy DNA *in vitro*. Wyniki negatywne wskazują, że w warunkach badawczych, badana substancja nie wywołuje uszkodzeń DNA, które są wykrywane przez to badanie.

Prawdopodobieństwo, że substancja badana dociera do głównego obiegu lub szczególnie do tkanki docelowej (np. toksyczność systemowa) powinno zostać omówione.

3. SPRAWOZDAWCZOŚĆ

SPRAWOZDANIE Z BADANIA

Sprawozdanie z badania musi zawierać następujące informacje:

Rozpuszczalnik/nośnik:

— uzasadnienie wyboru nośnika,

— rozpuszczalność oraz stabilność substancji w rozpuszczalniku / nośniku, jeżeli jest znana.

Badane zwierzęta:

— wykorzystane gatunki/szczepy,

— liczba oraz wiek zwierząt,

— źródło, warunki przetrzymywania, odżywianie itp.,

— indywidualna masa ciała zwierzęcia na początku badania, w tym zakres masy ciała, średnie oraz standardowe odstępstwa w odniesieniu do każdej z grup.

Warunki badania:

— pozytywne i negatywne nośnik/rozpuszczalnik kontrole,

— dane dotyczące studium określającego zakres badania, jeżeli zostało przeprowadzone,

— racjonalne uzasadnienie wyboru poziomu dawek,

— szczegóły dotyczące preparatu substancji badanej,

— szczegóły dotyczące podawania substancji badanej,

— szczegóły dotyczące drogi podawania substancji badanej,

— metody sprawdzania, czy dany czynnik badany dotarł do ogólnego obiegu lub tkanki docelowej, jeżeli ma zastosowanie,

— zmiana stężenia substancji badanej w odżywianiu/wodzie pitnej (ppm) na rzeczywistą dawkę (mg/kg masy ciała/dzień), jeżeli ma zastosowanie,

— szczegóły dotyczące jakości wody oraz żywności,

— szczegółowy opis poddania działaniu substancji oraz harmonogramów pobierania próbek,

— metody pomiaru toksyczności,

— metoda przygotowania i hodowli komórek wątroby,

— wykorzystana technika autoradiograficzna,

— liczba sporządzonych szkiełek mikroskopowych oraz liczba ocenionych komórek,

— kryteria oceny,

— kryteria uznawania badania za pozytywne, negatywne lub niejednoznaczne.

Wyniki:

— poszczególne szkiełka mikroskopowe, zwierzęta i grupy, średnie wartości ziarnistości jądrowych, ziarnistości cytoplazmowych, oraz względna ziarnistość jądrowa,

— relacja miedzy dawką a reakcją, jeżeli jest dostępna,

— ocena statystyczna, jeżeli istnieje,

— oznaki toksyczności,

— dane dotyczące równoległych negatywnych (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywnych kontroli,

— historyczne dane dotyczące negatywnej (rozpuszczalnik/nośnik) oraz pozytywnej kontroli z zakresem, średnimi oraz standardowymi odchyleniami,

— liczba »komórek w naprawie«, jeżeli jest oznaczona,

— liczba komórek S-fazy, jeżeli jest oznaczona,

— zdolność komórek do życia.

Omówienie wyników

Wnioski

4. **ODNIESIENIA**

(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."

ZAŁĄCZNIK 5

Zob.: Dyrektywa Komisji 2001/59/WE z 21.8.2001, str. 1.

ZAŁĄCZNIK 6

„ZAŁĄCZNIK IX

CZĘŚĆ A

Przepisy odnoszące się do zamknięć zabezpieczających przed dostępem dzieci

Oprócz przepisów w art. 22 ust. 1 lit. e) niniejszej dyrektywy, pojemniki o jakiejkolwiek pojemności zawierające substancje stwarzające zagrożenie w przypadku wdychania (Xn; R65) oraz klasyfikowane i etykietowane zgodnie z ppkt. 3.2.3 załącznika VI do niniejszej dyrektywy, z wyjątkiem substancji wprowadzanych do obrotu w postaci aerozoli lub w szczelnych pojemnikach ze spryskiwaczem, powinny być wyposażone w zamknięcia zabezpieczające przed dostępem dzieci.

1. *Opakowania zamykające się*

   Zamknięcia zabezpieczające przed dostępem dzieci wykorzystane w opakowaniach zamykających się są zgodne z normą ISO 8317 (edycja z dnia 1 lipca 1989 r.) odnoszącą się do »Opakowania zabezpieczające przed dostępem dzieci — Wymogi i metody testowania opakowań zamykających się« przyjęte przez Międzynarodową Organizację Normalizacyjną.

2. *Opakowania niezamykające się*

   Opakowania zabezpieczające przed dostępem dzieci wykorzystane w opakowaniach niezamykających się są zgodne z normą CEN EN 862 (edycja z marca 1997 r.) odnoszącą się do »Pakowania — opakowania zabezpieczające przed dostępem dzieci — Wymogi i procedury badawcze dotyczące opakowań niezamykających się dla produktów innych niż farmaceutyczne« przyjęte przez Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN).

3. *Uwagi*

   1. Dowody zgodności z powyższymi normami mogą zostać poświadczone wyłącznie przez laboratoria, które spełniają europejskie normy EN 45 000.

   2. Przypadki szczególne

      Jeżeli wydaje się oczywiste, że opakowanie jest wystarczająco bezpieczne dla dzieci, ponieważ nie mogą one uzyskać dostępu do zawartości bez pomocy narzędzia, badanie nie musi być przeprowadzane.

      We wszystkich pozostałych przypadkach oraz jeśli istnieją wystarczające podstawy, aby wątpić w bezpieczeństwo zamknięcia pod kątem dostępu dzieci, organ krajowy może poprosić osobę odpowiedzialną za wprowadzanie produktu do obrotu o przyznanie mu świadectwa z laboratorium, opisanego w ppkt. 3.1, stwierdzającego, że:

      — typ zamknięcia jest taki, iż nie jest konieczne badanie norm ISO lub CEN określonych powyżej,

        albo

      — opakowanie zostało zbadane i stwierdzono, iż jest ono zgodne z normami określonymi powyżej.

CZĘŚĆ B

Przepisy odnoszące się do urządzeń pozwalających na dokonanie identyfikacji, działających w oparciu o bodźce dotykowe

Specyfikacje techniczne w odniesieniu do urządzeń pozwalających na dokonanie identyfikacji, działających w oparciu o bodźce dotykowe są zgodne z normami EN, ISO 11683 (edycja z 1997 r.) odnoszącymi się do »Pakowanie — Ostrzeżenia o niebezpieczeństwie działające w oparciu o bodźce dotykowe — Wymagania«."