31988L0302

1988 5 30 EUROPOS BENDRIJŲ OFICIALUSIS LEIDINYS L 133/1

KOMISIJOS DIREKTYVA

1988 m. lapkričio 18 d.

devintąjį kartą su technikos pažanga derinanti Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo

(88/302/EEB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos ekonominės bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1967 m. birželio 27 d. Tarybos direktyvą 67/548/EEB dėl įstatymų ir kitų teisės aktų, reglamentuojančių pavojingų medžiagų klasifikavimą, pakavimą ir ženklinimą etiketėmis, suderinimo [1] su pakeitimais, padarytais šeštąją kartą Direktyva 79/831/EEB [2], ypač į jos 19 straipsnį,

kadangi Direktyvos 67/548/EEB 3 straipsnio 1 dalyje numatyta, kad medžiagų ir preparatų fizikinės bei cheminės savybės, toksiškumas bei ekotoksiškumas nustatomi V priede nurodytais metodais;

kadangi Direktyvos 67/548/EEB 3 straipsnio 2 dalyje numatyta, kad medžiagos arba preparato keliamas tikrasis arba galimas pavojus aplinkai įvertinamas pagal VII ir VIII prieduose išdėstytus rodiklius;

kadangi Komisijos Direktyva 84/449/EEB [3] priimtos redakcijos V priede šiuo metu yra išdėstyti tik tie bandymų metodai, kurie atitinka VII priede smulkiai išdėstytus rodiklius, todėl reikėtų apibrėžti bandymų metodus, atitinkančius VIII priede smulkiai išdėstytus rodiklius;

kadangi šios direktyvos nuostatos atitinka Direktyvų dėl techninių kliūčių panaikinimo pavojingų medžiagų ir preparatų prekybos srityje derinimo su technikos pažanga komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠIĄ DIREKTYVĄ:

1 straipsnis

Šios direktyvos priedo tekstas įrašomas į Direktyvos 67/548/EEB V priedą.

2 straipsnis

Iki 1988 m. gruodžio 31 d. valstybės narės priima ir paskelbia priemones, būtinas, kad būtų laikomasi šios direktyvos, ir apie tai nedelsdamos praneša Komisijai. Šias priemones jos pradeda taikyti ne vėliau kaip nuo 1989 m. birželio 30 d.

3 straipsnis

Ši direktyva skirta valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 1987 m. lapkričio 18 d.

Komisijos vardu

Stanley CLINTON DAVIS

Komisijos narys

---

[1] OL 196, 1967 8 16, p. 1/67.
[2] OL L 259, 1979 10 15, p. 10.
[3] OL L 251, 1984 9 19, p. 1.

PRIEDAS

Šiame priede aprašyti bandymų metodai yra skirti kai kurioms Tarybos direktyvos 79/831/EEB VIII išvardytoms toksikologinėms ir ekotoksikologinėms savybėms nustatyti. Pateikiami VIII priedo 1 bei 2 lygiams tinkantys bandymų metodai, tačiau šie bandymai neskirstomi pagal skirtingų lygių funkcijas.

TURINYS

	Puslapis
B DALIS. Toksiškumo nustatymo metodai	93
Bendrasis įvadas: B dalis	93
Pusiau chroninis oralinio toksiškumo tyrimas. 90 dienų trunkantis kartotinės dozės davimo graužikams *per os* tyrimas	97
Pusiau chroninis oralinio toksiškumo tyrimas. 90 dienų trunkantis kartotinės dozės davimo ne graužikams *per os* tyrimas	101
Pusiau chroninis oralinio toksiškumo tyrimas. 90 dienų trunkantis kartotinės dozės davimo graužikams per odą tyrimas	105
Pusiau chroninis įkvėpimo toksiškumo tyrimas. 90 dienų trunkantis kartotinės įkvepiamos dozės tyrimas graužikų rūšyse	109
Teratogeniškumo tyrimas – graužikai ir negraužikai	113
Chroninis toksiškumo testas	116
Karcinogeniškumo testas	121
Kombinuotas chroninio toksiškumo/karcinogeniškumo testas	126
Vienos kartos dauginimosi toksiškumo testas	132
Dviejų kartų dauginimosi toksiškumo testas	136
Toksikokinetika	140
Mutageniškumo tyrimas ir atranka pagal karcinogeniškumą:	144
— Genų mutacijos – *Saccaromyces cerevisiae*	144
— Mitozinė rekombinacija – *Saccharomyces cerevisiae*	147
— Žinduolių ląstelių genų mutacijų tyrimas *in vitro*	150
— DNR pažaidos ir jų reparacija – neplanuota DNR sintezė – žinduolių ląstelėse *in vitro*	153
— Apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis tyrimas *in vitro*	157
— Su lytimi susijęs recesyvinis letalus testas *Drosophila melanogaster* tarpe	160
— Žinduolių ląstelių transformacijos testai *in vitro*	162
— Graužikų dominantinis letalinis testas	165
— Žinduolių embrioninės ląstelės citogenetinis tyrimas *in vivo*	168
— Pelių taškinis testas	171
— Pelių paveldėta translokacija	174
C DALIS. Ekotoksiškumo nustatymo metodai	177
Bendrasis įvadas. C dalis	177
Dumblių inhibavimo bandymas	178
Toksiškumo sliekams matavimas. Dirbtinio dirvožemio bandymas	184
Biologinis skaidymas. Zahn-Wellens bandymas	188
Biologinis skaidymas. Aktyviojo dumblo modeliavimo bandymas	195
Biologinis skaidymas. Aktyviojo dumblo kvėpavimo inhibavimo bandymas	207
Biologinis skaidymas. Modifikuotas SCAS bandymas	212

B DALIS: TOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI

BENDRASIS ĮVADAS: B DALIS

ILGALAIKIAI TYRIMAI

Pusiau chroniniai, chroniniai ir ilgalaikiai tyrimai

Tiriamosios medžiagos ir mišinio, kuriuo veikiama, apibūdinimas

Prieš pradedant bet kokius toksiškumo tyrimus, reikėtų žinoti tiriamosios medžiagos sudėtį, įskaitant pagrindines priemaišas bei jos esmines fizines ir chemines savybes, įskaitant stabilumą.

Tiriamosios medžiagos fizinės ir cheminės savybės pateikia svarbią informaciją, pagal kurią pasirenkamas medžiagos davimo būdas, suplanuojami pusiau chroniniai, chroniniai ir karcinogeniškumo tyrimai bei kuria remiantis, medžiaga naudojama ir saugoma.

Informacija apie cheminę struktūrą ir fizines bei chemines savybes taipogi gali suteikti žinių bei nurodyti požymius, pagal kuriuos sprendžiama apie absorbcijos charakteristikas, naudojant pasirinktą davimo būdą ir apie metabolitines bei pasiskirstymo audiniuose galimybes. Taipogi gali būti pateikiama informacija apie anksčiau atliktų toksiškumo bei toksikokinetinių tyrimų metu nustatytus toksikokinetinius parametrus.

Prieš pradedant tyrimą reikia sukurti analitinį metodą, skirtą tiriamosios medžiagos, esančios dozuojamoje terpėje bei biologinėje medžiagoje, kiekybinėms bei kokybinėms savybėms (įskaitant, jei įmanoma ir pagrindines priemaišas) nustatyti.

Eksperimentiniai gyvūnai: rūšies ir kamieno pasirinkimas

Kadangi yra svarbu gyvūnus veikti tiriamąja medžiaga didžiąją jų gyvenimo dalį, todėl tyrimuose turėtų būti naudojamos lengvai palaikomos ir trumpai gyvenančios gyvūnų rūšys. Labai pageidaujama, kad būtų žinoma apie spontaninių ligų bei navikų pasireiškimo laipsnį naudojamo kamieno gyvūnų, laikomų tomis pačiomis sąlygomis, tarpe.

Kamienai turėtų būti detaliai apibūdinti ir neturėti jokių trukdančių įgimtų sutrikimų. Naudojant inbredinius kamienus, pirmosios palikuonių kartos (F1) hibridai yra pranašesni šiuo aspektu, tačiau jei yra pakankamai sukaupta anksčiau gautų duomenų apie autbredinius gyvūnų, gautų iš uždarų grupių, kamienus, tai tokie kamienai yra tinkami.

Gyvūnų priežiūra, vandens ir pašaro tiekimas

Gyvūnų tyrimai ir patikrinimai turėtų būti atliekami, atsižvelgiant į nacionalines nuostatas, o taipogi į humaniškumo principus bei pasiekimus gyvūnų gerovės srityje pasauliniu mastu.

Tam, kad būtų gauti reikšmingi rezultatai, būtina griežtai kontroliuoti aplinkos sąlygas bei laikytis tinkamų gyvūnų priežiūros priemonių. Tokie faktoriai, kaip laikymo sąlygos, atsitiktinės ligos, gydymas vaistais, priemaišos pašaruose, vandenyje, ore ir kraike bei bendrosios patalpos, skirtos gyvūnų priežiūrai, gali labai įtakoti kartotinės dozės tyrimų išeigą. Apskritai, atliekant tyrimą, reikėtų žinoti apie cheminių sterilizuojančių medžiagų sukeliamus efektus.

Pašaras tirėtų atitikti tiriamos rūšies gyvūnų šėrimui keliamus reikalavimus, be to jame neturėtų būti jokių priemaišų, galinčių turėti įtakos tyrimo metu gaunamiems rezultatams. Graužikai turėtų būti šeriami bei girdomi *ad libitum*, pašarą keičiant mažiausiai kas savaitę. Šiuo metu naudojami 3 šėrimo būdai: šėrimas įprastiniais, sintetiniais bei įvairiausios cheminės sudėties pašarais.

Nekreipiant dėmesio į tai, koks šėrimo būdas buvo pasirinktas, tiekėjai periodiškai privalo įsitikinti, nustatinėdami pagrindinio pašaro mitybinę vertę bei užteršimo lygį bei pateikti šią informaciją laboratorijai apie kiekvieną pašaro partiją. Ypač pageidaujama, kad būtų žinoma šėrimo režimo įtaka metabolizmui, navikų vystymuisi bei gyvūnų amžiaus trukmei.

Be to,, tiriančioji laboratorija galėtų atlikti tiek pašaro sudedamųjų komponentų, tiek ir nenumatytų teršalų, įskaitant karcinogenus, patikrą. Jeigu šitai yra padaryta, tai analizių rezultatai yra išsaugojami ir pateikiami galutiniame pranešime apie tiriamąją medžiagą.

Įprastinės pašarų sudedamosios dalys, kurios, kaip yra žinoma, įtakoja karcinogenezę (pvz., antioksidantai, neprisotintos riebiosios rūgštys, selenas), neturėtų viršyti nustatytų koncentracijų. Atliekant karcinogeniškumo tyrimus, reikia ypač atkreipti dėmesį į keleto įprastinių pašarų teršalų galimą poveikį, pašaruose esant pesticidų liekanoms, organochlorino junginiams, policikliniams aromatiniams angliavandeniliams, estrogenams, sunkiesiems metalams, nitrozaminams ir mikotoksinams.

Jei tiriamoji medžiaga duodama su pašaru ir vandeniu, tai būtina atlikti stabilumo tyrimus. Tinkamai vykdomi stabilumo ir homogeniškumo tyrimai turėtų būti panaudoti nustatant kaip dažnai reikia ruošti pašarą bei atlikti reikalingą priežiūrą.

Kai pašarai yra sterilizuojami, tai reikia žinoti apie tokių veiksmų įtaką tiriamajai medžiagai bei pašaro sudedamosioms dalims. Reikia atlikti bet kokius būtinus koregavimus.

Atlikdami kancerogeniškumo tyrimus, tyrėjai turi būti informuoti apie galimus teršalus, esančius naudojamame vandenyje. Turi būti galimybė gauti informaciją apie vandenį, naudojamą žmonių reikmėms apskritai.

Gyvūnams augant, pašare esančios tiriamosios medžiagos koncentracija sureguliuojama taip, kad pastoviai būtų įsisavinamas palyginus vienodas tiriamosios medžiagos kiekis kūno masės atžvilgiu.

Tiriamojo ir kontrolinio pašarų mitybinės vertės turi kaip galima labiau atitikti viena kitą. Todėl reikia apsvarstyti tiriamosios medžiagos, sumaišytos su pašaru, mitybinę vertę. Patirtis rodo, kad pašaruose esančių iki 5 % ne mitybai skirtų tiriamųjų medžiagų neturi didesnės įtakos pašaro mitybinei vertei.

1. **Įkvėpimo tyrimai**

Joks ribų paieškos tyrimas nėra nurodomas, kadangi buvo nustatyta, jog neįmanoma nustatyti pavienio įkvėpimo ekspozicijos ribinės vertės.

2. **Teratogeniškumo tyrimas**

Tyrimo metodas pirmiausia skirtas medžiagos davimui *per os*. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais, priklausomai nuo tiriamosios medžiagos fizinių savybių bei nuo žmonių ekspozicijos su tiriamąja medžiaga būdo. Tokiais atvejais, tyrimo metodas turėtų būti tinkamai pritaikomas, atsižvelgiant į atitinkamus metodų, trunkančių 28 dienas, elementus.

3. **Toksikokinetika**

Toksikokinetiniai tyrimai padeda aiškinti bei vertinti duomenis, gautus toksiškumo tyrimo metu. Šie tyrimai yra skirti įvertinti konkrečius tiriamosios cheminės medžiagos toksiškumo aspektus ir gauti rezultatai gali padėti planuojant vėlesnius toksiškumo tyrimus. Nėra numatyta, kad visus parametrus reikia nustatinėti kiekvienu atveju. Tiktai retais atvejais reikia atlikti visą eilę toksikokinetinių (absorbcijos, ekskrecijos, pasiskirstymo bei metabolizmo) tyrimų. Konkrečių junginių atveju gali būti rekomenduojama pakeisti šią tyrimų eilę arba pakanka atlikti pavienės dozės tyrimą.

Apibrėžimai

Toksikokinetika:	tiriamųjų medžiagų absorbcijos, pasiskirstymo, metabolizmo ir ekskrecijos tyrimas;
Absorbcija:	procesas (-ai), kurio (-ių) pagalba duota medžiaga patenka į organizmą;
Ekskrecija:	procesas (-ai), kurio (-ių) pagalba duota medžiaga ir (ar) jos skilimo produktai pasišalina iš organizmo;
Pasiskirstymas:	procesas (-ai), kurio (-ių) pagalba absorbuota medžiaga ir (ar) jos skilimo produktai pasiskirsto organizme;
Metabolizmas:	procesas (-ai), kurio (-ių) pagalba organizme esančių duotų medžiagų struktūra pakinta dėl fermentinių ar nefermentinių reakcijų.

4. **Ūmus ir pusiau ūmus antrinių rūšių tyrimas**

Antrinių rūšių tyrimo tikslas papildyti išvadas gautas anksčiau atlikto tyrimo metu.

Tiriant antrines rūšis, aukščiau aprašytas tyrimo metodas gali būti panaudotas arba pritaikytas mažesniam gyvūnų skaičiui tirti.

5. **Vaisingumo tyrimai**

Jei reikia atlikti trečiosios kartos dauginimosi tyrimą, tai aprašytas metodas skirtas antrosios kartos dauginimuisi tirti gali būti išplėstas, kad apimtų ir trečiąją kartą.

6. **Mutageniškumo tyrimas**

Papildomi mutageniškumo tyrimai įskaitant atrankos pagal kancerogeniškumą tyrimus

Direktyvos VIII priede yra minimi papildomi tyrimai, siekiant detaliau ištirti mutageniškumą arba karcinogeniškumui iš anksto numatyti. Apskritai šiame skirsnyje minimi tyrimai galėtų būti naudojami bet kokiems aspektams tirti.

Įvadas

Atliekant pradinį medžiagos mutageninio aktyvumo įvertinimą, tiriamos bakterijų genų (taškinės) mutacijos bei citogenetiniai žinduolių ląstelių pažeidimai (*in vitro* ir *in vivo*); metodai, tinkami šiam „bazinio rinkinio“ tyrimams atlikti buvo aprašyti anksčiau. Šiame skirsnyje aprašomi papildomi tyrimai, kurie tinka bazinio rinkinio tyrimų metu gautų rezultatų patvirtinimui bei praplėtimui atlikti ir kurie gali būti naudojami daugeliui tikslų pasiekti:

1) bazinio rinkinio tyrimų metu gautiems rezultatams patvirtinti;

2) bazinio rinkinio tyrimų metu nenustatytiems galutiniams parametrams tirti;

3) tyrimams *in vivo* pradėti ar išplėsti.

Šiems tikslams pasiekti aprašytų tyrimų metu naudojamos eukariotų sistemos tiek *in vitro*, tiek *ir vivo* bei išplėstos galutinių parametrų ribos. Tyrimų metu gaunama informacija apie organizmų, sudėtingesnių nei bazinio rinkinio tyrimuose naudojamos bakterijos, taškines mutacijas bei pateikia papildomos informacijos apie medžiagos gebą sukelti chromosomines aberacijas.

Taipogi aprašyti tyrimai, kurių metu skirtingai nei taškinės mutacijos ar chromosominės aberacijos nustatomi ir kiti galutiniai parametrai. Šie parametrai suteikia papildomos informacijos ir jei yra tinkami, gali būti naudojami planuojant tyrimus.

Reikėtų laikytis principo: aptariant tolimesnių mutageniškumo tyrimų programą, ji turi būti sudaryta taip, kad būtų pateikta svarbi papildoma informacija apie medžiagos mutageninę ir (ar) karcinogeninę gebą.

Šiuo metu atliekami tyrimai, kurie gali tikti konkrečiu atveju, priklausys nuo daugelio faktorių, tokių kaip medžiagos cheminių bei fizinių savybių, pradinių bandymų, kai buvo tiriamos bakterijos ir citogenetiniai pažeidimai, metu gautų rezultatų, medžiagos metabolizmo ypatumų, kitų toksiškumo tyrimų rezultatų ir žinomų medžiagos panaudojimo sričių. Griežta tyrimų parinkimo tvarka netinka dėl įvairių faktorių, kuriuos reikėtų apsvarstyti. Tačiau galima vadovautis keliais bendrais principais. Jei tyrimo, priklausančio baziniam rinkiniui, metu buvo gauti teigiami rezultatai, tai papildomų tyrimų metu reikia parinkti mažiausiai bent vieną tyrimą, kurio metu būtų galima nustatyti galutinius genetinius parametrus. Jei abiejų tyrimų, priklausančių baziniam rinkiniui, metu buvo gauti neigiami rezultatai, tai papildomų tyrimų laikotarpiu, kaip įprasta, reikėtų ištirti genų mutacijas bei chromosomų aberacijas. Taipogi galima gauti papildomus duomenis, atliekant toliau pateiktus indikatorinius bandymus.

Toliau pateikiami tokių tyrimų metodai, sugrupuoti remiantis jų metu gaunamais esminiais galutiniais genetiniais parametrais.

Genų (taškinių) mutacijų tyrimai

Tam, kad toliau tirti medžiagos gebą sukelti taškines (genų) mutacijas, reikėtų panaudoti vieną arba kitą tyrimą, pateikiamą žemiau:

a) tiesioginių arba grįžtamųjų mutacijų (reversijų) tyrimai, panaudojant eukariotinius mikroorganizmus (*Saccharomyces cerevisiae*);

b) tiesioginių mutacijų žinduolių ląstelėse tyrimai *in vitro*;

c) su *Drosophila melanogaster* lytimi sukibusio recesyvinio letalaus geno alelio analizė;

d) somatinių ląstelių mutacijų analizė *in vivo*: pelių taškinių mutacijų tyrimas.

Chromosominių aberacijų tyrimai

Tam, kad būtų galima tirti medžiagos gebą sukelti chromosomines mutacijas, galima atlikti vieną ar kitą tyrimą:

a) žinduolių citogenetiniai tyrimai *in vivo*;

Reikėtų apsvarstyti kaulų čiulpų ląstelių metafazinių chromosomų analizę, jei ši nebuvo atliekama pradinio įvertinimo metu („bazinio rinkinio tyrimuose“). Papildomai galima tirti embrioninių ląstelių citogenetinius aspektus;

b) žinduolių ląstelių citogenetiniai tyrimai *in vitro*, jei šie nebuvo atliekami pradinio įvertinimo metu;

c) graužikų dominantinių letalių genų alelių tyrimai;

d) pelių paveldimų chromosomų translokacijų tyrimas.

Indikatoriniai efektų DNR atžvilgiu tyrimai

Galima taikyti metodus, kuriais nustatomi tam tikri efektai nesukeliantys mutacijų kaip „genetiniai parametrai“ DNR atžvilgiu. Šių tyrimų metu galima gauti informaciją, papildančią gaunamą, tiriant mutageniškumą ir kuri gali būti naudinga aiškinant tokių tyrimų rezultatus. Kai yra būtina atlikti tokius tyrimus, tai galima pasirinkti tokius metodus, kurių metu naudojami eukariotiniai mikroorganizmai arba žinduolių ląstelės:

a) *Saccharomyces cerevisiae* ląstelėse vykstančios mitozės rekombinacija;

b) DNR pažeidimai ir jų reparacija – nenumatyta DNR sintezė – žinduolių ląstelės (*in vitro*);

c) apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis žinduolių ląstelėse tyrimas (*in vitro*).

Kiti karcinogeninės gebos indikatoriniai tyrimai

Galima atlikti žinduolių ląstelių transformacijos analizę, kurios metu įvertinama medžiagos geba sukelti morfologinius bei elgesio pokyčius ląstelių kultūroje, kurie, kaip manoma yra susiję su ląstelių piktybine transformacija *in vivo*. Galima panaudoti daug skirtingų ląstelių tipų bei kriterijų transformacijai įvertinti.

Rizikos susijusios su paveldimais efektais žinduoliuose įvertinimas

Paveldimi efektai visuose žinduoliuose atsiradę dėl genų (taškinių) mutacijų ar chromosomų aberacijų nustatomi, tiriant pelių specifinį lokusą ([4]) arba pelių paveldimą chromosomų translokaciją. Tokie metodai gali būti naudojami tada, kai įvertinama galima medžiagos poveikio žmogui genetinė rizika. Prieš pradedant šiuos tyrimus, dėl jų tyrimų sudėtingumo bei labai didelio būtino eksperimentinių gyvūnų skaičiaus, ypač reikalingo, tiriant specifinį lokusą, reikia pateikti labai įtikinamus argumentus šiems tyrimams pagrįsti ([1]).

([1]) Pelės specifinio lokuso tyrimas (neaprašytas šiame dokumente) gali būti naudojamas įvertinti pirmosios kartos embrioninės ląstelės mutaciją atsiradusią po poveikio mutageniška medžiaga. Galima kokybiškai bei kiekybiškai nustatyti genų produktų, sukuriančių matomus fenotipus, pokyčius, atsiradusius dėl genetinių deformacijų.

PUSIAU CHRONINIS ORALINIO TOKSIŠKUMO TYRIMAS

90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS DOZĖS DAVIMO GRAUŽIKAMS *PER OS* TYRIMAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Tiriamoji medžiaga duodama nustatytomis dozėmis keleto eksperimentinių grupių gyvūnams kiekvieną dieną *per os*, vieną dozę duodant vienos grupės gyvūnams 90 dienų. Duodant medžiagą, gyvūnai stebimi kiekvieną dieną tam, kad būtų nustatomi toksiškumo požymiai. Gyvūnai, kurie nugaišta tyrimo metu, skrodžiami, o atlikus tyrimą, skrodžiami visi kiti gyvūnai, likę gyvi.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Prieš tyrimą gyvūnai yra laikomi mažiausiai 5 dienas eksperimentinėje fermoje, kur jie šeriami. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

Tiriamoji medžiaga gali būti duodama su pašaru, per zondą, su kapsulėmis ar geriamuoju vandeniu. Visu eksperimento metu visiems gyvūnams medžiagos dozės duodamos tokiu pačiu būdu. Jei, siekiant palengvinti dozės davimą, naudojama įranga arba priedai, tai turi būti žinoma, kad jie nesukelia toksinių efektų. Galima panaudoti anksčiau atliktų eksperimentų duomenis, jei jie tinka.

Tyrimo sąlygos

Eksperimentiniai gyvūnai

Išskyrus kontraindikacijas, labiausiai naudojama gyvūnų rūšis yra žiurkės. Reikėtų naudoti įprastinius jaunų sveikų gyvūnų laboratorinius kamienus ir geriausia pradėti duoti medžiagą dozėmis, kai bet kuriuo atveju žiurkės yra šešių ir ne daugiau kaip aštuonerių savaičių amžiaus. Naudojamų gyvūnų kūno masės nukrypimas tyrimo pradžioje neturėtų būti didesnis nei ± 20 % vidutinės kūno masės. Jei pusiau chroninis dozės, duodamos *per os*, tyrimas atliekamas taip pat kaip ir išankstinis ilgalaikis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu naudojami tos pačios rūšies bei kamieno gyvūnai.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze, reikėtų naudoti mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinėlių). Patelės turėtų būti dar negimdžiusios ir ne nėščios. Jeigu numatoma atlikti gyvūnų, esančių grupėje, numarinimą, tai tiriamų gyvūnų skaičius turi būti padidintas tiek, kiek gyvūnų planuojama numarinti prieš pasibaigiant tyrimui. Be to,, 90 dienų laikotarpiu papildomai 20 (po 10 kiekvienos lyties) gyvūnų grupei gali būti duodama ypatingai didelė tiriamosios medžiagos dozė tam, kad praėjus mėnesiui po veikimo būtų stebimas toksinių efektų grįžtamumas, išlikimo pastovumas bei pavėluotas pasireiškimas.

Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios bei kontrolinė dozės. Išskyrus tą laikotarpį, kai tiriamoji medžiaga yra duodama, kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip kontrolinės grupės individai. Jeigu dozavimui naudojamas įrenginys, tai kontrolinei grupei dozės šiuo įrenginiu turi būti duodamos tokiu pačiu būdu kaip ir tiriamosioms grupėms ir kontrolinė grupė turi gauti tą pačią įrenginiu duotą dozę, kurią gavo tiriamoji grupė, kuriai, panaudojus įrenginį, buvo duota didžiausia dozė. Davus didžiausią medžiagos dozę, turėtų pasireikšti toksiniai efektai, tačiau ši dozė neturi būti mirtina arba jei mirtina, tai tik keletas individų turi mirti. Mažiausia duota dozė neturėtų sukelti jokio toksiškumo. Ši dozė turėtų būti mažesnė nei toji, kuri vartojama praktiškai įvertinant poveikį žmogui. Geriausia būtų, kad vidutinė dozė sukeltų minimalaus toksiškumo požymius. Jeigu naudojama daugiau nei viena vidutinė dozė, tai dozės turi būti padalijamos taip, kad sukeltų toksiškumą palaipsniui.

Kontrolinės grupės ir grupių, kurioms duodamos mažiausios bei vidutinės dozės, gyvūnų mirtingumas turėtų būti toks, kad būtų galima įvertinti rezultatų reikšmingumą.

Kai tiriamoji medžiaga duodama su pašaru arba esant jos pastoviai koncentracijai pašare (ppm arba mg/pašaro kg) arba gali būti panaudota pastovi dozė gyvūno kūno masės atžvilgiu; jei tiriamoji medžiaga vartojama kitaip nei nurodyta čia, tai nurodomas jos vartojimo būdas. Medžiagos, duodamos per zondą, dozė turėtų būti duodama kiekvieną dieną keletą kartų panašiu metu. Duodama dozė turėtų būti taip nustatoma laiko intervalais (kiekvieną savaitę ar kas dvi savaites), kad būtų išlaikoma pastovi dozė gyvūno kūno masės atžvilgiu.

Ribų tyrimas

Jei pagal žemiau aprašytą metodą atliekamas 90 dienų trunkantis tyrimas, kai naudojant vieną dozę — 1 000 mg kūno masės kilogramui per dieną arba didesnę dozę, su kuria susiduria žmogus, ir jei žinoma, kad tokia dozė nesukelia toksinių efektų, tai tolimesnis tyrimas laikomas nebūtinu. Svarbu užtikrinti, kad nedidelį toksiškumą sukeliančių medžiagų, duodamų su pašaru, savybės bei kiekiai netrukdų normaliems mitybiniams komponentams.

Stebėjimų laikotarpis

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, ir toksiškumo požymiai registruojami, nurodant jų pasireiškimo pradžią, laipsnį ir trukmę. Reikėtų užregistruoti mirties laiką ir tą momentą, kai toksiškumo požymiai pasireiškia bei išnyksta.

Procedūra

Geriausia, kad tiriamosios medžiagos dozė gyvūnams būtų duodama septynis kartus per savaitę 90 dienų laikotarpiu. Bet kokios kitos pagalbinės grupės gyvūnai turi būti laikomi dar mėnesiui ir neduodant jiems medžiagos tam, kad būtų stebimas jų organizmo atsistatymas po toksinio poveikio arba toksinių efektų pasireiškimo pastovumas.

Stebint narveliuose laikomus gyvūnus, reikia registruoti odos bei kailio, o taip pat akių ir gleivinių membranas bei kvėpavimo, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemos pokyčius, somatomotorinį aktyvumą ir elgseną. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą (ir vandens suvartojimą kai tiriamoji medžiaga yra duodama su geriamu vandeniu) bei pasverti gyvūnus.

Reikėtų kiek įmanoma pastoviau stebėti gyvūnus tam, kad būtų galima užtikrinti, jog šie nebūtų prarandami tyrimo metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei laikymo vietos praradimas. Baigiantis tyrimui, visi likę gyvi nepagalbinės grupės gyvūnai, nepaveikti tiriamąja medžiaga, skrodžiami. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinami ir, kai nurodoma, skrodžiami.

Įprastiniu atveju visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinius individus yra tiriami šitaip:

a) Prieš pradedant duoti tiriamąją medžiagą bei pasibaigus tyrimui, panaudojant oftalmoskopą ar jam ekvivalentišką tinkamą prietaisą, turėtų būti ištiriamos visų, bet pirmiausia gavusių didžiausią dozę ir priklausančių kontrolinei grupei, gyvūnų akys. Jeigu nustatomi pokyčiai akyse, reikėtų ištirti visus gyvūnus.

b) Baigiantis tyrimui, reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius bei, remiantis krešėjimo trukme, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukme arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičiumi, nustatyti krešėjimo potencialą.

c) Baigiantis tyrimui reikėtų atlikti kraujo biocheminius tyrimus. Atliekant šiuos tyrimus, reikėtų, jei laikoma reikalinga, nustatyti elektrolitų balansą, angliavandenių metabolizmą bei įvertinti kepenų ir inkstų veiklą. Parenkant specifinius tyrimus, reikėtų atsižvelgti į tiriamosios cheminės medžiagos veikimo būdo tyrimo

metu gautus duomenis. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą, natrį, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai galimą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę ([1]), serumo glutamato oksalacetato transaminazę ([2]), ornitino dekarboksilazę, γ glutamino transpeptidazę, šlapale esantį azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinine, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą. Kitiems tyrimams, kurie gali būti reikalingi tam, kad būtų atliktas pakankamas toksikologinis įvertinimas, priklauso lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo nustatymas. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina detaliau išnagrinėti nustatytus reiškinius.

d) Nereikalaujama, kad šlapimo analizė būtų atliekama pagal nusistovėjusią tvarką, išskyrus tuos atvejus, kai remiantis duomenimis, numatomas arba nustatomas toksiškumas.

Jeigu anksčiau atliktų pagrindinių tyrimų duomenys laikomi nepakankamais, tai prieš pradedant duoti dozes reikia apsvarstyti hematologinių ir klinikinių biocheminių parametrų nustatymą.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, kurio metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po skrodimo kuo skubiau pasveriamos kepenys, inkstai, antinksčiai ir kiaušinėliai tam, kad būtų išvengta jų džiūties.

Vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai, laikomi tinkamoje terpėje: visi esminiai pažeidimai, smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, bet koks užkrūčio liaukos audinys, trachėja ir plaučiai, širdis, aorta, (seilių liaukos), kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), (oda), stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (moterų pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, krūtinkaulis su kaulų čiulpais, (akys), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens), ir (eksorbitalinės ašarų liaukos). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik tada, kai nustatomas toksiškumas arba tiriamas medžiagos poveikis į organą-taikinį.

Histopatologinis tyrimas

a) Reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnus.

b) Reikėtų ištirti visus esminius pažeidimus.

c) Reikėtų ištirti grupių, kurioms duodamos kitos medžiagos dozės, gyvūnų organus-taikinius.

d) Reikėtų histopatologiškai ištirti grupės, kuriai buvo duodama nedidelė ir vidutinė medžiagos dozė, gyvūnų plaučius, kad nustatyti infekciją, kadangi šis tyrimas tinka įvertinti gyvūnų sveikatą. Reikėtų taipogi apsvarstyti šių grupių gyvūnų kepenų bei inkstų histopatologinę analizę. Nėra reikalaujama, kad pagal nusistovėjusią tvarką šių grupių gyvūnai būtų toliau histopatologiškai tiriami, tačiau, kai gyvūnų, priklausančių grupei, kuriai buvo duota didelė medžiagos dozė, organizme nustatomi pažeidimai, tai gyvūnų organai 'turėtų būti visada ištirti.

e) Kai naudojama pagalbinė grupė, tai reikėtų atlikti tų audinių ir organų histopatologinę analizę, kuriuose buvo nustatyti reiškiniai ir kurie gauti iš gyvūnų, paveiktų tiriamąja chemine medžiaga.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose pasireiškė sutrikimai, skaičius bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo sutrikimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatai turėtų būti vertinami atitinkamu statistiniu metodu. Galima panaudoti bet kokį visuotinai pripažintą statistinį metodą.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos,

— dozės lygiai (įskaitant įrangą, jei ši buvo panaudota) ir koncentracijos,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

([1]) Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.
([2]) Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

— jei įmanoma, dozės lygis, kuriam esant jokių efektų nebuvo pastebėta,
— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,
— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,
— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių stebėjimo laikas,
— duomenys apie pašarą bei kūno masę,
— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,
— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,
— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,
— skrodimo metu gauti duomenys,
— histopatologinių tyrimų metu gautų visų duomenų detalus apibūdinimas,
— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma tai padaryti,
— rezultatų aptarimas,
— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

PUSIAU CHRONINIS ORALINIO TOKSIŠKUMO TYRIMAS

90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS DOZĖS DAVIMO NE GRAUŽIKAMS *PER OS* TYRIMAS

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Tiriamoji medžiaga duodama nustatytomis dozėmis keleto eksperimentinių grupių gyvūnams (ne graužikams) kiekvieną dieną *per os*, vieną dozę duodant vienos grupės gyvūnams 90 dienų. Duodant medžiagą, gyvūnai stebimi kiekvieną dieną tam, kad būtų nustatomi toksiškumo požymiai. Gyvūnai, kurie miršta tyrimo metu, yra skrodžiami, o likę gyvi gyvūnai skrodžiami tyrimo pabaigoje.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Prieš tyrimą gyvūnai yra laikomi mažiausiai 5 dienas eksperimentinėje fermoje, kur jie šeriami. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

Tiriamoji medžiaga gali būti duodama su pašaru, per zondą, arba geriau su kapsulėmis. Galima naudoti ir kitus *per os* davimo būdus. Eksperimento metu medžiagos dozės visiems gyvūnams duodamos tokiu pačiu būdu. Jei, siekiant palengvinti dozės davimą, naudojama įranga arba priedai, tai turi būti žinoma, kad jie nesukelia toksinių efektų. Galima panaudoti anksčiau atliktų eksperimentų duomenis, jei jie tinka.

Tyrimo sąlygos

Eksperimentiniai gyvūnai

Dažniausiai naudojama ne graužikų rūšis yra konkrečios veislės šuo. Gali būti naudojami ir kitos ne graužikų rūšys. Reikėtų naudoti jaunus sveikus gyvūnus ir šunims geriausia pradėti duoti medžiagą dozėmis, kai jie yra 4–6 mėnesių ir ne daugiau kaip 9 mėnesių amžiaus. Jei pusiau chroninis dozės, duodamos *per os*, tyrimas atliekamas taip pat kaip ir išankstinis ilgalaikis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu turėtų būti naudojami tos pačios rūšies bei kamieno gyvūnai.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze, reikėtų naudoti mažiausiai 8 gyvūnus (4 pateles ir 4 patinėlius). Tyrimo pabaigoje gyvūnų skaičius turi būti pakankamas, kad būtų galima atlikti svarbų toksinių reiškinių įvertinimą.

Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios bei viena kontrolinė dozės. Išskyrus tą laikotarpį, kai duodama tiriamoji medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip kontrolinės grupės individai. Davus didžiausią medžiagos dozę, turėtų pasireikšti toksiniai efektai, tačiau ši dozė neturi būti mirtina. Mažiausia duota dozė neturėtų sukelti jokio toksiškumo.

Ši dozė turėtų būti mažesnė nei toji, kuri vartojama praktiškai įvertinant poveikį žmogui. Geriausia, kad tarpinė dozė sukeltų minimalaus toksiškumo požymius. Jeigu naudojama daugiau nei viena tarpinė dozė, tai dozės turi būti padalijamos taip, kad sukeltų toksiškumą palaipsniui.

Kontrolinėje bei tiriamosiose grupėse, kurioms duodamos mažiausios ir vidutinės dozės, neturi pasitaikyti mirties atvejų.

Svarbu užtikrinti, kad kai su pašaru yra duodamos mažo toksiškumo medžiagos, tiriamosios medžiagos kiekiai nepakenktų įprastinei mitybai.

Kai tiriamoji medžiaga duodama su pašaru arba esant jos pastoviai koncentracijai pašare (ppm arba mg/pašaro kg) arba gali būti panaudota pastovi dozė gyvūno kūno masės atžvilgiu; jei tiriamoji medžiaga vartojama kitaip nei nurodyta čia, tai nurodomas jos vartojimo būdas. Kai dozė duodama tiesiogiai, pvz., su kapsule, tai jinai turėtų būti duodama kiekvieną dieną keletą kartų panašiu metu ir nustatoma laiko intervalais taip (kiekvieną savaitę ar kas dvi savaites), kad būtų išlaikoma pastovi dozė gyvūno kūno masės atžvilgiu. Tuo atveju, kai iš pradžių atliekamas pusiau chroninis tyrimas, o vėliau ilgalaikis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu turėtų būti paprastai naudojamas tas pats pašaras.

Ribų tyrimas

Jei pagal žemiau aprašytą metodą atliekamas 90 dienų trunkantis tyrimas, kai naudojant vieną dozę – 1 000 mg kūno masės kilogramui per dieną arba didesnę dozę, su kuria susiduria žmogus ir jei žinoma, kad tokia dozė nesukelia toksinių efektų, tai tolimesnis tyrimas laikomas nebūtinu. Svarbu užtikrinti, kad nedidelį toksiškumą sukeliančios medžiagos, kai jos duodamos su pašaru, tai tiriamosios medžiagos esamos savybės bei kiekiai netrukdo normaliems mitybiniams komponentams.

Stebėjimų laikotarpis

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną ir registruojami toksiškumo požymiai, nurodant jų pasireiškimo pradžią, laipsnį ir trukmę. Reikėtų užregistruoti mirties laiką ir tą momentą, kai toksiškumo požymiai pasireiškia bei išnyksta.

Procedūra

Geriausia, kad gyvūnams duodama tiriamosios medžiagos dozė septynis kartus per savaitę 90 dienų laikotarpiu. Tačiau, pirmiausia remiantis praktiniais sumetimais, kai medžiaga yra duodama kitaip nei su pašaru, tai priimtina, kad ji būtų duodama dozėmis penkiskart per savaitę.

Stebint nereikia apsiriboti vien tik odos bei kailio, o taip pat akių ir gleivinių membranas bei kvėpavimo, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemos pokyčių bei somatomotorinio aktyvumo ir elgsenos registravimu. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą (ir vandens suvartojimą kai tiriamoji medžiaga yra duodama su geriamu vandeniu) bei pasverti gyvūnus.

Reikėtų kiekvieną dieną detaliai tirti gyvūnus klinikiniu aspektu bei imtis atitinkamų priemonių, kad būtų galima sumažinti gyvūnų mirtingumą tyrimo metu. Baigiantis tyrimui, visi likę gyvi nepagalbinės grupės gyvūnai, nepaveikti tiriamąja medžiaga, skrodžiami. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinami ir, kai nurodoma, skrodžiami.

Įprastiniu atveju visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinius individus yra tiriami šitaip:

a) Prieš pradedant duoti tiriamąją medžiagą bei pasibaigus tyrimui, panaudojant oftalmoskopą ar jam ekvivalentišką tinkamą prietaisą, turėtų būti ištiriamos visų, bet pirmiausia gavusių didžiausią dozę ir priklausančių kontrolinei grupei, gyvūnų akys. Jeigu nustatomi pokyčiai akyse, reikėtų ištirti visus gyvūnus.

b) Prieš prasidedant tyrimui, vėliau kas mėnesį arba tyrimo viduryje ir galiausiai tyrimo pabaigoje reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius bei, remiantis krešėjimo trukme, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukme arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičiumi, nustatyti krešėjimo potencialą.

c) Prieš prasidedant tyrimui, vėliau kas mėnesį arba tyrimo viduryje ir galiausiai tyrimo pabaigoje reikėtų atlikti kraujo biocheminius tyrimus. Atliekant šiuos tyrimus, jei būtina, reikėtų nustatyti elektrolitų balansą, angliavandenių metabolizmą bei įvertinti kepenų ir inkstų veiklą. Parenkant specifinius tyrimus, reikėtų atsižvelgti į tiriamosios cheminės medžiagos veikimo būdo tyrimo metu gautus duomenis. Siūloma nustatyti kalcį fosforą, chlorą, natrį, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai/veislei galimą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę ([1]), serumo glutamato oksalacetato transaminazę ([2]), ornitino dekarboksilazę, γ glutamilo transpeptidazę, šlapale esantį

([1]) Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.
([2]) Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinine, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą. Kitiems tyrimams, kurie gali būti reikalingi tam, kad būtų atliktas pakankamas toksikologinis įvertinimas, priklauso lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo nustatymas. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina detaliau išnagrinėti nustatytus reiškinius. Prieš imant kraujo mėginius iš ne graužikų, šie turėtų badauti kurį laiką (ne ilgiau kaip 24 valandas).

d) Nėra reikalaujama, kad pagal nusistovėjusią tvarką būtų atliekama šlapimo analizė, išskyrus tuos atvejus, kai remiantis duomenimis, numatomas arba nustatomas toksiškumas.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, kurio metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po skrodimo kuo skubiau pasveriamos kepenys, inkstai, antinksčiai, tiroidinė liauka (kartu su paratireoidiniais dariniais) ir kiaušinėliai tam, kad būtų išvengta jų džiūties.

Vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai, laikomi tinkamoje terpėje: visi esminiai pažeidimai, smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, bet koks užkrūčio liaukos audinys, (trachėja), plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), (oda), tulžies pūslė, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (moterų pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, krūtinkaulis su kaulų čiulpais, (akys), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik tada, kai nustatomas toksiškumas arba tiriamas medžiagos poveikis į organą-taikinį.

Histopatologinis tyrimas

Reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnus. Tolimesnis grupių, kurioms duodamos kitos dozės, tolimesnis histopatologinis tyrimas turėtų būti atliekamas, panaudojant organus, kuriuose pastebėti pažeidimai, davus didžiausią dozę arba tuos organus, kuriuos reikėtų tirti, remiantis klinikiniais stebėjimais.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose pasireiškė sutrikimai, skaičius, pažeidimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo sutrikimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatai turėtų būti vertinami atitinkamu statistiniu metodu. Galima panaudoti bet kokį visuotinai pripažintą statistinį metodą.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos,

— dozės lygiai (įskaitant prietaisą, jei šis buvo naudotas) ir koncentracijos,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— jei įmanoma, dozės lygis, kuriam esant jokių efektų nebuvo pastebėta,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,

— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas (ypač atkreipiant dėmesį į klinikinių tyrimų duomenis),

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių stebėjimo laikas,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai;

— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— histopatologinių tyrimų metu gautų visų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma tai padaryti,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

PUSIAU CHRONINIS ODOS TOKSIŠKUMO TYRIMAS

90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS DOZĖS DAVIMO GRAUŽIKAMS PER ODĄ TYRIMAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Tiriamoji medžiaga uždedama nustatytomis dozėmis ant keleto eksperimentinių grupių gyvūnų odos paviršiaus, vieną dozę duodant vienos grupės gyvūnams 90 dienų. Uždedant medžiagą, gyvūnai stebimi kiekvieną dieną tam, kad būtų nustatomi toksiškumo požymiai. Gyvūnai, kurie miršta tyrimo metu, yra skrodžiami, o likę gyvi gyvūnai skrodžiami tyrimo pabaigoje.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Visai prieš pat tyrimą nuo tiriamųjų gyvūnų nugaros nukerpamas kailis. Kailį galima ir nuskusti, tačiau tai reikėtų atlikti likus vienai parai iki tyrimo pradžios. Paprastai kartotinis nukirpimas ar nuskutimas atliekamas kas savaitę. Kai kailis kerpamas arba skutamas, reikia stengtis nenubrūžinti odos. Uždedant tiriamąją medžiagą reikia stengtis, kad būtų nuvalyta ne mažiau kaip 10 % viso kūno paviršiaus. Sprendžiant, kuri kūno paviršiaus dalis bus nuvalyta ir kiek bus uždedama tiriamosios medžiagos, reikia atsižvelgti į gyvūno kūno masę. Tiriant kietąsias medžiagas, jei reikia, jos gali būti sutrinamos į miltelius, tiriamąją medžiagą reikėtų pakankamai sudrėkinti vandeniu arba, jei būtina, panaudoti tinkamą įrenginį tam, kad būtų galima užtikrinti gerą tiriamosios medžiagos ir odos sąlytį. Skystosios tiriamosios medžiagos paprastai vartojamos nepraskiestos. Medžiagos paprastai uždedamos 5–7 dienas per savaitę.

Tyrimo sąlygos

Eksperimentiniai gyvūnai

Gali būti naudojama suaugusi žiurkė, triušis ar jūrų kiaulytė. Gali būti naudojamos ir kitos rūšys, tačiau reikia apsvarstyti jų panaudojimą. Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų siekti ± 20 % kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis odos tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze, reikėtų naudoti mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinėlių), turinčių sveiką odą. Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numarinimai numatomi iš anksto, tai tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numarinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių. Be to, 90 dienų bėgyje papildoma 20 gyvūnų (po 10 kiekvienos lyties) grupė veikiama didele medžiagos doze ir praėjus mėnesiui po veikimo, stebimas toksinių efektų grįžtamumas, nepertraukiamumas ar sulėtintas pasireiškimas.

Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios dozės naudojant kontrolinę dozę arba kontrolinį prietaisą, jei toks yra naudojamas. Dozės poveikis turėtų išlikti mažiausiai 6 valandas per dieną. Tiriamoji medžiaga turėtų būti duodama kiekvieną dieną tuo pačiu metu ir medžiaga, kuria veikiama, turi būti duodama tokiu kiekiu su pertraukomis (kas savaitę ar kas dvi savaites), kad būtų palaikoma ta pati medžiagos dozė gyvūno kūno masės atžvilgiu. Išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir tiriamosios grupės individai. Jei prietaisas naudojamas dozavimui, tai medžiaga, duodama kontrolinės grupės gyvūnams, naudojant prietaisą, turi būti dozuojama tokiu pat būdu kaip ir medžiaga, duodama tiriamosios grupės gyvūnams bei turi būti gaunamas toks kiekis, koks buvo gautas, davus didžiausią medžiagos dozę tiriamajai grupei. Davus didžiausią medžiagos dozę, turėtų pasireikšti toksiniai efektai, tačiau ši dozė neturi būti mirtina arba gali sukelti tik pavienių gyvūnų mirtį. Mažiausia duota dozė neturėtų sukelti jokio toksiškumo. Ši dozė turėtų būti mažesnė nei toji, kuri vartojama praktiškai įvertinant poveikį žmogui. Geriausia, jog tarpinė dozė sukeltų minimalaus toksiškumo požymius. Jeigu naudojama daugiau nei viena tarpinė dozė, tai dozės turi būti padalijamos taip, kad sukeltų toksiškumą palaipsniui. Mirtingumo laipsnis mažos ir tarpinės dozės grupėse, o taipogi kontrolinėje grupėje turi būti žemas tam, kad būtų galima įvertinti rezultatų reikšmingumą.

Jeigu tiriamoji medžiaga, kuria veikiama, ypač suerzina odą, tai reikėtų sumažinti jos koncentracijas ir šitai galbūt susilpnintų medžiagos, duodamos didele doze, sukeliamus toksinius efektus arba šie visai išnyktų. Jei oda buvo ypač pažeista, tai reikia tučtuojau nutraukti tyrimą ir pradėti naują, naudojant mažesnes tiriamosios medžiagos koncentracijas.

Ribų tyrimas

Jei atliekamas išankstinis tyrimas, naudojant 1 000 mg kilogramui arba didesnę dozę, kuri, kaip nustatoma, nesukelia jokių toksinių efektų žmogui, tai laikomasi nuostatos, jog tolimesnis tyrimas nėra būtinas.

Stebėjimų laikotarpis

Tiriamieji gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną, registruojant toksiškumo požymius. Reikia nurodyti mirties bei toksiškumo požymių pasireiškimo ir išnykimo laiką.

Procedūra

Gyvūnai turėtų būti laikomi atskirai. Geriausiu atveju gyvūnai turėtų būti veikiami duodama tiriamąja medžiaga septynis kartus per savaitę 90 dienų laikotarpiu.

Gyvūnai, esantys bet kurioje pagalbinėje grupėje ir skirti vėlesniems stebėjimams, turėtų būti laikomi dar mėnesį, neveikiant juos medžiaga tam, kad būtų galima jų atsistatymą po toksinių efektų poveikio ar pačių toksinių efektų pasireiškimo nepertraukiamumą. Veikimas medžiaga turėtų trukti šešias valandas per dieną.

Tiriamoji medžiaga turėtų būti tvarkingai uždedama ant odos paviršiaus, sudarančio apie 10 % viso kūno paviršiaus ploto. Jei naudojamos ypač toksiškos medžiagos, tai odos paviršiaus, ant kurio uždedamos medžiagos, plotas gali būti mažesnis, tačiau reikėtų kaip galima daugiau šio ploto tvarkingai padengti plona ir tikslia kaip fotojuosta, plėvele.

Veikimo metu tiriamoji medžiaga kontaktuoja su oda, padengus pastarąją poringa marle ar odos neerzinančia juostele. Vėliau tiriamoji odos vieta yra taip padengiama, kad išliktų poringa marlė bei tiriamoji medžiaga ir kad būtų užtikrinta, jog gyvūnai nepraris tiriamosios medžiagos. Tam, kad būtų išvengta prarijimo, galima naudoti ribojančias priemones, tačiau visiška imobilizacija nėra rekomenduojama.

Veikimo pabaigoje nuo odos, ją plaunant vandeniu ar kokiu kitu atitinkamu valymo būdu turėtų būt pašalintas tiriamosios medžiagos likutis.

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną ir registruojami toksiškumo požymiai, įskaitant jų pasireiškimo pradžią, laipsnį bei trukmę. Stebint narveliuose laikomus gyvūnus, reikia registruoti odos bei kailio, o taip pat akių ir gleivinių membranas bei kvėpavimo, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemos pokyčius, somatomotorinį aktyvumą ir elgseną. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą (ir vandens suvartojimą kai tiriamoji medžiaga yra duodama su geriamu vandeniu) bei pasverti gyvūnus. Reikėtų kiek įmanoma pastoviau stebėti gyvūnus tam, kad užtikrinti, jog šie nebūtų prarandami tyrimo metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei laikymo vietos praradimas. Baigiantis tyrimui, visi likę gyvi nepagalbinės grupės gyvūnai, nepaveikti tiriamąja medžiaga, skrodžiami. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinami ir, kai nurodoma, skrodžiami.

Įprastiniu atveju visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinius individus yra tiriami šitaip:

a) Prieš pradedant duoti tiriamąją medžiagą bei pasibaigus tyrimui, panaudojant oftalmoskopą ar jam ekvivalentišką tinkamą prietaisą, turėtų būti ištiriamos visų, bet pirmiausia gavusių didžiausią dozę ir priklausančių kontrolinei grupei, gyvūnų akys. Jeigu nustatomi pokyčiai akyse, reikėtų ištirti visus gyvūnus.

b) Prieš pasibaigiant tyrimui, reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius ir įvertinti krešėjimo potencialą, remiantis tokiais kriterijais, kaip krešėjimo trukme, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukmė arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičius.

c) Prieš pasibaigiant tyrimui, reikėtų atlikti kraujo biocheminius tyrimus. Atliekant šiuos tyrimus, reikėtų, jei reikalinga, nustatyti elektrolitų balansą, angliavandenių metabolizmą bei įvertinti kepenų ir inkstų veiklą. Parenkant specifinius tyrimus, reikėtų atsižvelgti į tiriamosios medžiagos veikimo būdo tyrimo duomenis. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą, natrį, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai/veislei galimą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę ([1]), serumo glutamato oksalacetato transaminazę ([2]), ornitino dekarboksilazę, γ glutamilo transpeptidazę, šlapale esantį azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinine, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą.

Kitiems tyrimams, kurie gali būti reikalingi pakankamam toksikologiniam įvertinimui, priklauso lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo nustatymas. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina detaliau išnagrinėti nustatytus reiškinius.

d) Nereikalaujama, kad pagal nusistovėjusią tvarką būtų atliekama šlapimo analizė, išskyrus tuos atvejus, kai remiantis duomenimis, numatomas arba nustatomas toksiškumas.

Jeigu neįmanoma gauti anksčiau atliktų tyrimų pagrindinių duomenų, tai, prieš pradedant medžiagos davimą dozėmis, reikėtų apsvarstyti hematologinius ir klinikinius biocheminius parametrus.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, kurio metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po skrodimo kuo skubiau pasveriamos kepenys, inkstai, antinksčiai, tiroidinė liauka (kartu su paratireoidiniais dariniais) ir kiaušinėliai tam, kad būtų išvengta jų džiūties. Vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai, laikomi tinkamoje terpėje: visi esminiai pažeidimai, smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, bet koks užkrūčio liaukos audinys, (trachėja), plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), tulžies pūslė, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (moterų pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, (akys), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens) ir (ašarų liaukos). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik tada, kai nustatomas toksiškumas arba tiriamas medžiagos poveikis organui).

Histpatologinis tyrimas

a) Reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnus.

b) Reikėtų ištirti visus pagrindinius pažeidimus.

c) Reikėtų ištirti gyvūnų, kurie veikiami kitomis medžiagos dozėmis, organus, paveikiamus medžiaga.

d) Jei naudojamos žiurkės, reikėtų histopatologiniu aspektu ištirti gyvūnų, kurie veikiami mažomis ir tarpinėmis medžiagos dozėmis, plaučius tam, kad įsitikinti, jog jie nėra užkrėsti, nes šituo remiantis nesunkiai galima įvertinti gyvūnų sveikatos būklę. Vėliau šių gyvūnų nebereikia tirti histopatopatologiniu aspektu, tačiau būtina atlikti gyvūnų, kurie veikiami didele medžiagos doze, histopatologinę analizę.

e) Kai naudojama pagalbinė grupė, tai reikia atlikti audinių ir organų, kuriuose, tiriant kitas gyvūnų grupes, paveiktas tiriamąja medžiaga, buvo pastebėti medžiagos sukelti efektai, histopatologinę analizę.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pažeidimai, skaičius, pažeidimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pažeidimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokį statistinį metodą, vartojamą visuotinu mastu.

([1]) Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.
([2]) Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos,

— dozės lygiai (įskaitant prietaisą, jei šis buvo naudojamas) ir koncentracijos,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— jei įmanoma, dozės lygis, kuriam esant jokių efektų nebuvo pastebėta,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,

— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas (ypač atkreipiant dėmesį į klinikinių tyrimų duomenis),

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių, pastebėjimo momentas,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,

— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

PUSIAU CHRONINIS ĮKVĖPIMO TOKSIŠKUMO TYRIMAS

90 DIENŲ TRUNKANTIS KARTOTINĖS ĮKVEPIAMOS DOZĖS TYRIMAS GRAUŽIKŲ RŪŠYSE

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Tiriamąja medžiaga laipsniškomis koncentracijomis veikiama keletas eksperimentinių gyvūnų grupių kiekvieną dieną apibrėžtą laikotarpį, vienos grupės gyvūnus veikiant vienos koncentracijos medžiaga 90 dienų laikotarpiu. Kai naudojamas prietaisas, norint pasiekti atitinkamą tiriamosios medžiagos koncentraciją atmosferoje, turėtų būti naudojama kontrolinė grupė, kurios gyvūnai veikiami medžiaga to prietaiso pagalba. Veikimo metu gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną tam, kad būtų registruojami toksinių efektų pasireiškimo požymiai. Gyvūnai, kurie nugaišta tyrimo metu, skrodžiami, o atlikus tyrimą visi tie gyvūnai, kurie liko gyvi.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi eksperimentinėje fermoje, kur jie šeriami. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Jei būtina, kartu su tiriamąja medžiaga, kuria veikiama, naudojamas atitinkamas prietaisas, kuris sukuria atitinkamą tiriamosios medžiagos koncentraciją atmosferoje. Jei dozavimui naudojamas prietaisas ar kiti priedai, tai jie neturėtų sukelti toksinių efektų. Jei yra reikalinga, tai galima naudotis anksčiau vykdytų tyrimų duomenimis.

Tyrimo sąlygos

Eksperimentiniai gyvūnai

Tinkamiausia naudoti gyvūnų rūšis – žiurkės, nebent yra kontraindikacijų. Reikėtų naudoti įprastinius jaunų sveikų gyvūnų laboratorinius kamienus ir geriausia pradėti duoti medžiagą dozėmis, kai bet kuriuo atveju žiurkės yra šešių ir ne daugiau kaip aštuonerių savaičių amžiaus. Naudojamų gyvūnų kūno masės nukrypimas tyrimo pradžioje neturėtų būti didesnis nei ± 20 % vidutinės kūno masės. Jei prieš pradedant ilgalaikį tyrimą, yra atliekamas pusiau chroninis įkvėpimo tyrimas, tai abiejų tyrimų metu yra naudojamos tos pačios rūšys ir kamienai.

Skaičius ir lytis

Esant kiekvienai medžiagos, kuria veikiama, koncentracijai, reikėtų naudoti mažiausiai 20 gyvūnų (10 patelių ir 10 patinėlių). Patelės turėtų būti dar negimdžiusios ir ne nėščios. Jeigu numatoma atlikti gyvūnų, esančių grupėje, numarinimą, tiriamų gyvūnų skaičius turi būti padidintas tiek, kiek gyvūnų planuojama numarinti prieš pasibaigiant tyrimui. Be to, 90 dienų laikotarpiu papildoma 20 (po 10 kiekvienos lyties) gyvūnų grupė gali būti veikiama didele tiriamosios medžiagos koncentracija, kad praėjus mėnesiui po veikimo būtų stebimas toksinių efektų grįžtamumas, išlikimo pastovumas bei pavėluotas pasireiškimas.

Medžiagos, kuria veikiama, koncentracijos

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios bei viena kontrolinė koncentracijos. Išskyrus tą laikotarpį, kai veikiama tiriamąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti laikomi tomis pačiomis sąlygomis kaip ir tiriamosios grupės individai. Esant didžiausiai koncentracijai, turėtų pasireikšti toksiniai efektai, tačiau ši koncentracija neturėtų būti mirtina arba jei mirtina, tai tik keletas individų turi nugaišti. Mažiausia koncentracija neturėtų sukelti jokio toksiškumo. Ši koncentracija turėtų būti mažesnė nei toji, kuri vartojama praktiškai įvertinant poveikį žmogui. Geriausia būtų, kad vidutinė koncentracija sukeltų minimalius toksiškumo požymius. Jeigu naudojama daugiau nei viena vidutinė koncentracija, tai koncentracijos turi būti padalijamos taip, kad toksiškumo požymiai pasireikštų laipsniškai. Kontrolinės grupės ir grupių, kurios veikiamos mažomis bei tarpinėmis koncentracijomis, gyvūnų mirtingumas turėtų būti toks, kad būtų galima įvertinti rezultatų reikšmingumą.

Veikimo trukmė

Tyrimų kameroje suvienodinus esančios ore medžiagos koncentracijas, kasdien atliekamas veikimas turėtų trukti šešias valandas.

Prietaisas

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirtu prietaisu, suprojektuotu taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Jei naudojama kamera, ji turėtų būti sukonstruota taip, kad gyvūnai joje būtų kuo mažiau susigrūdę, o tiriamoji medžiaga kuo geriau patektų į gyvūnų kvėpuojamąjį traktą. Tam, kad būtų užtikrintas kameroje esančio oro pastovumas, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio. Kameroje esančius gyvūnus galima veikti tiriamąja medžiaga, šiai patenkant į gyvūnų organizmą per burną ir nosį arba per visą kūno paviršių; pirmieji du medžiagos patekimo būdai labai sumažina medžiagos patekimą į organizmą kitais būdais.

Stebėjimų laikotarpis

Visi gyvūnai turėtų būti stebimi kiekvieną dieną ir registruojami toksiškumo požymiai, nurodant jų pasireiškimo pradžią, laipsnį ir trukmę. Reikėtų užregistruoti mirties laiką ir tą momentą, kai toksiškumo požymiai pasireiškia bei išnyksta.

Procedūra

Geriausia, kad tiriamosios medžiagos dozė gyvūnams būtų duodama septynis kartus per savaitę 90 dienų laikotarpiu. Bet kokios kitos pagalbinės grupės gyvūnai turi būti laikomi dar mėnesiui ir neduodant jiems medžiagos tam, kad būtų stebimas jų organizmo atsistatymas po toksinio poveikio arba toksinių efektų pasireiškimo pastovumas. Tyrimo metu turėtų būti palaikoma 22 ± 3 °C temperatūra. Optimali santykinė drėgmė turėtų būti 30–70 %, tačiau kai kuriais atvejais (pvz., tiriant aerozolius) tai nebūtina. Veikimo metu pašaras ir girdymas turėtų išlikti nepakitę.

Reikėtų naudoti dinaminę įkvėpimo sistemą kartu su atitinkama analitine koncentracijos kontrolės sistema. Atitinkamos medžiagos, kuria veikiama, koncentracijoms nustatyti reikėtų atlikti bandomąjį tyrimą. Oro srautą reikėtų sureguliuoti taip, kad būtų užtikrintos homogeniškos sąlygos kameroje, kurioje veikiama tiriamąja medžiaga. Sistema turėtų užtikrinti, kad veikimo sąlygų pastovumas būtų pasiekiamas kaip galima greičiau.

Matavimai ar stebėjimas turėtų būti grindžiamas:

a) oro srauto intensyvumu (pastoviai);

b) tikrąja tiriamosios medžiagos, esančios kvėpuojamojoje zonoje, koncentracija. Atliekant veikimą kasdien, tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų keistis ± 15 % vidutinės vertės. Tačiau dulkių ir aerozolių atveju toks kontrolės lygis nebūtinas ir priimtinos platesnės ribos. Kasdieninės koncentracijos turėtų būti palaikomos kuo pastovesnės. Kuriant palaikančiąją sistemą, reikėtų atlikti dalelių dydžio analizę tam, kad būtų užtikrintas aerozolių koncentracijų pastovumas. Veikimo metu reikėtų kaip galima dažniau atlikti analizę tam, kad būtų nustatomas dalelių pasiskirstymo pastovumas;

c) temperatūra ir drėgmė;

d) atliekamo ir po jo sekančio veikimo metu užregistruojami ir sistemingai protokoluojami stebėjimai; reikėtų atskirai registruoti kiekvieną gyvūną. Visus gyvūnus reikėtų stebėti kasdien ir registruoti toksiškumo požymius, įskaitant požymių pasireiškimo laiką, laipsnį bei trukmę. Stebint narveliuose laikomus gyvūnus, reikia registruoti odos bei kailio, o taip pat akių ir gleivinių membranas bei kvėpavimo, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemos pokyčius, somatomotorinį aktyvumą ir elgseną. Kiekvieną savaitę reikėtų įvertinti pašaro suvartojimą (ir vandens suvartojimą kai tiriamoji medžiaga yra duodama su geriamu vandeniu) bei pasverti gyvūnus. Reikėtų kiek įmanoma pastoviau stebėti gyvūnus tam, kad užtikrinti, jog šie nebūtų prarandami tyrimo metu dėl tokių priežasčių kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei laikymo vietos praradimas. Baigiantis tyrimui, visi likę gyvi nepagalbinės grupės gyvūnai, nepaveikti tiriamąja medžiaga yra skrodžiami. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinami ir, kai nurodyta, skrodžiami.

Įprastai visi gyvūnai, įskaitant ir kontrolinius individus, tiriami taip:

a) Prieš pradedant duoti tiriamąją medžiagą bei pasibaigus tyrimui, panaudojant oftalmoskopą ar jam ekvivalentišką tinkamą prietaisą, turėtų būti ištiriamos visų, bet pirmiausia gavusių didžiausią dozę ir priklausančių kontrolinei grupei, gyvūnų akys. Jeigu nustatomi pokyčiai akyse, reikėtų ištirti visus gyvūnus.

b) Baigiantis tyrimui reikėtų įvertinti tokius hematologinius rodiklius kaip hematokritas, hemoglobino koncentracija, eritrocitų skaičius, absoliutus bei skirtingų populiacijų leukocitų skaičius bei nustatyti krešėjimo potencialą, remiantis tokiais rodikliais, kaip krešėjimo trukme, protrombino ir tromboplastino susidarymo trukme arba kraujo plokštelių (trombocitų) skaičiumi.

c) Baigiantis tyrimui reikėtų atlikti kraujo biocheminius tyrimus. Atliekant šiuos tyrimus, reikėtų, jei reikalinga, nustatyti elektrolitų balansą, angliavandenių metabolizmą bei įvertinti kepenų ir inkstų veiklą. Parenkant specifinius tyrimus, reikėtų atsižvelgti į tiriamosios cheminės medžiagos veikimo būdo tyrimo metu gautus duomenis. Siūloma nustatyti kalcį, fosforą, chlorą, natrį, kalį, badavimo metu susidarančią gliukozę (atsižvelgiant į konkrečiai gyvūnų rūšiai galimą badavimo laikotarpį), serumo glutamato piruvato transaminazę ([1]), serumo glutamato oksalacetato transaminazę ([2]), ornitino dekarboksilazę, γ glutamino transpeptidazę, šlapale esantį azotą, albuminą, bendrą bilirubino, esančio kraujo kreatinine, kiekį bei atlikti serumo baltymų bendro kiekio nustatymą. Kitiems tyrimams, kurie gali būti reikalingi tam, kad būtų atliktas pakankamas toksikologinis įvertinimas, priklauso lipidų, hormonų rūgščių/šarmų balanso, methemoglobino ir cholinesterazės aktyvumo nustatymas. Papildomi biocheminiai tyrimai gali būti atliekami tuo atveju, kai būtina detaliau išnagrinėti nustatytus reiškinius.

d) Nereikalaujama, kad šlapimo analizė būtų atliekama pagal nusistovėjusią tvarką, išskyrus tuos atvejus, kai remiantis duomenimis, numatomas arba nustatomas toksiškumas.

Jeigu anksčiau atliktų pagrindinių tyrimų duomenys laikomi nepakankamais, prieš pradedant duoti dozes reikia apsvarstyti hematologinių ir klinikinių biocheminių parametrų nustatymą.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, kurio metu tiriamas kūno išorinis paviršius, visos angos, kiaušo, krūtinės ir pilvo ertmės bei jų turinys. Po skrodimo kuo skubiau pasveriamos inkstai, kepenys, antinksčiai ir kiaušinėliai tam, kad būtų išvengta jų džiūties. Vėlesniems histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai, laikomi tinkamoje terpėje: visi esminiai pažeidimai, plaučiai, kurie turėtų būti išimti nepažeisti, pasverti ir apdoroti tinkamu fiksatyvu tam, kad būtų išlaikyta plaučių struktūra (efektyvi procedūra – perfuzija fiksatyvu), smegenys – įskaitant pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūvius, smegenėlių ir smegenų žievę, hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, bet koks užkrūčio liaukos audinys, trachėja ir plaučiai, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, kasa, lytinės liaukos, gimda (pagalbiniai lytiniai organai), (oda), tulžis (jei yra duomenys), stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, šlapimo pūslė, pagrindinis (didysis) limfmazgis, (moterų pieno liauka), (šlaunies raumenynas), periferinis nervas, krūtinkaulis su kaulų čiulpais, (akys), (šlaunikaulis, įskaitant ir segmentinį paviršių), (stuburo smegenys trimis lygiais – sprando, krūtinės ląstos ir juosmens). Audinius, paminėtus skliausteliuose, reikia tirti tik tada, kai nustatomas toksiškumas arba tiriamas medžiagos poveikis į organą-taikinį.

Histopatologinis tyrimas

a) Reikėtų visapusiškai histopatologiškai ištirti kontrolinės grupės ir tos grupės, kuriai duodama didelė medžiagos dozė, gyvūnus.

b) Reikėtų ištirti visus pagrindinius pažeidimus.

c) Reikėtų ištirti gyvūnų, kurie veikiami kitomis medžiagos dozėmis, organus, paveikiamus medžiaga.

d) Mažų ir vidutinių dozių grupių gyvūnų plaučiai taip pat turėtų būti ištirti histopatologiškai, kadangi tai gali padėti lengviau įvertinti gyvūnų sveikatos būklę. Tolesnė šių grupių gyvūnų histopatologinė analizė neprivaloma. Tačiau visada būtina ištirti didelių dozių grupės gyvūnų organus, turinčius pažeidimo požymių.

e) Kai naudojama pagalbinė grupė, tai reikia atlikti audinių ir organų, kuriuose, tiriant kitas gyvūnų grupes, paveiktas tiriamąja medžiaga, buvo pastebėti medžiagos sukelti efektai, histopatologinę analizę.

([1]) Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.
([2]) Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pažeidimai, skaičius, pažeidimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pažeidimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokį visuotinai vartojamą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas: įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerozolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerozolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumą.

Veikimo metu gauti duomenys: duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greičius;

b) oro temperatūrą ir drėgmę;

c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpimo įrangoje esantis tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);

d) prietaiso, jei jis naudojamas, pobūdį;

e) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoje kvėpuojamoje zonoje;

f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— jei įmanoma, duomenų lygis, kuriam esant, jokių efektų nebuvo pastebėta,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,

— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių pastebėjimo momentas,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,

— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė (jei įmanoma),

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

TERATOGENIŠKUMO TYRIMAS – GRAUŽIKAI IR NEGRAUŽIKAI

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Tiriamoji medžiaga duodama laipsniškomis dozėmis arba koncentracijomis keleto eksperimentinių grupių gyvūnų nėščioms patelėms tuo nėštumo periodo metu, kai vyksta organogenezė, vieną dozę duodant vienos grupės gyvūnams. Prieš pat numatomą medžiagos pasisavinimą veislinės patelės numarinamos, pašalinama gimda ir tiriamas jos turinys. Tyrimo metu įvertinamas embriono ir gemalo toksiškumas.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Likus mažiausiai 5 dienoms prieš prasidedant tyrimui, sveikos jaunos subrendusios ir nekaltos panašaus amžiaus ir dydžio gyvūnų patelės aklimatizuojamos laboratorijos sąlygomis ir po to suporuojamos su žinomu vaisingumu pasižyminčiais patinais. Apvaisintos patelės atsitiktinai atrenkamos ir suskirstomos į grupes, kurios bus veikiamos medžiaga.

Suporavimas gali būti atliekamas natūraliai arba dirbtinai apsėklinant. Tiriamoji medžiaga duodama patelėms kiekvieną dieną iškart po implantavimo ir visu organogenezės periodu. Likus vienai dienai iki tyrimo pabaigos, histerektomijos būdu pašalinami gemalai ir tiriamos jų visceralinės (snukio) bei skeleto anomalijos, įskaitant sulėtėjusį augimą, sulėtėjusį sukaulėjimą ar plonųjų žarnų hemoragijas.

Tyrimo sąlygos

Eksperimentiniai gyvūnai

Paprastai naudojamos žiurkės, pelės, žiurkėnai ir triušiai. Labiausiai – žiurkės ir triušiai. Reikėtų naudoti įprastinius laboratorinius kamienus. Kamienas neturėtų pasižymėti mažu vaisingumu ir turėtų būti apibūdintas jo sukuriamas atsakas į teratogenus. Gyvūnai turėtų būti laikomi narveliuose, atskirai.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtingomis dozėmis, reikėtų naudoti mažiausiai 20 nėščių žiurkių, pelių bei žiurkėnų patelių arba 12 nėščių triušių patelių. Tikslas yra užtikrinti, jog būtų pakankamas vadų ir jose esančių jauniklių skaičius tam, kad būtų galima įvertinti medžiagos teratogeninį aktyvumą.

Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios bei viena kontrolinė dozės. Jeigu tiriamoji medžiaga duodama naudojant prietaisą, kontrolinei grupei medžiaga turi būti duodama taip pat naudojant tą prietaisą. Jeigu naudojamas prietaisas, turėtų būti suprantamos jo toksikologinės ypatybės, jis neturi būti teratogeniškas ar daryti įtaką dauginimuisi. Išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga, kontrolinės grupės gyvūnai turėtų būti

laikomi tokiomis pat sąlygomis kaip ir tiriamosios grupės individai. Nepaisant ribotumo, susijusio su tiriamosios medžiagos fizikine/chemine prigimtimi ar biologinėmis savybėmis, geriausiu atveju didžiausia jos dozė turėtų sukelti aiškiai išreikštą motininį toksiškumą, pasireiškiantį nedideliu svorio sumažėjimu, tačiau ne daugiau kaip 10 % patelių turi mirti. Mažiausia duota tiriamosios medžiagos dozė neturėtų sukelti jokių akivaizdžių toksiškumo požymių. Tarpinė dozė tirėtų būti geometriškai išdėstyta tarp didelės ir mažos dozių.

Ribų tyrimas

Kai medžiagos pasižymi nedideliu toksiškumu, ir jei dozei siekiant mažiausiai 1 000 mg kūno masės kilogramui, nepasireiškia embriono toksiškumas ar teratogeniškumas, laikomasi nuostatos, kad tyrimai, naudojant kitas medžiagos dozes, nėra reikalingi.

Veikimo laikas

Nulinė tyrimo diena yra ta, kurios metu stebima makšties kamštis ir (arba) sperma (jei įmanoma). Dozę reikėtų duoti pagrindinės organogenezės metu. Šitai galėtų būti atliekama 6–15 dieną pelėse ir žiurkėse, 6–14 dieną žiurkėnuose arba 6–18 dieną triušiuose. Jei nulinę dieną stebimas suporavimas arba dirbtinis apsėklinimas, tai aukščiau minimas laikas turi būti pratęstas viena diena. Kitaip sakant, dozė gali būti papildomai duodama dar vieną dieną, likusią iki numatomo medžiagos pasisavinimo laiko.

Stebėjimų laikotarpis

Mažiausiai vieną kartą kasdien reikėtų atlikti išsamų klinikinį tyrimą. Kiekvieną dieną reikėtų atlikti papildomus stebėjimus ir imtis atitinkamų priemonių, kad tiriamų gyvūnų gaišimas būtų sumažintas.

Procedūra

Tiriamoji medžiaga duodama per burną, su kapsule. Tiriamoji medžiaga turėtų būti duodama kasdien, tuo pačiu metu.

Tiriamųjų gyvūnų patelės veikiamos tiriamąja medžiaga kasdien visu atitinkamu veikimo periodu. Dozė gali būti parenkama, remiantis patelių svoriu prieš duodant medžiagą arba pagal greitą svorio priaugimą nėštumo metu, gyvūnai gali būti periodiškai sveriami ir dozė gali būti parenkama, remiantis pačiais naujausiais duomenimis apie kūno masę. Toksiškumo požymiai turėtų būti registruojami, vos tik jie pastebimi, įskaitant pasireiškimo laiką, laipsnį ir trukmę. Patelės, kurios prieš subrendimą pasisavino medžiagą arba kurioms įvyko persileidimas, numarinamos ir tiriamos makroskopiškai. Pasibaigus veikimui, stebėjimo periodas turi trukti tol, kol liks viena diena iki nustatyto laiko; tai daroma tam, kad būtų atliekamas stebėjimas visu nėštumo periodu ir išvengta klaidingo rezultatų aiškinimo, atsirandančio dėl po to sekančio natūralaus gimimo. Gyvūnų stebėjimas narveliuose neturėtų apsiriboti odos ir kailio pakitimų, akių ir gleivinių membranų stebėjimais, taipogi reikėtų stebėti kvėpavimą, apytaką, autonominę bei centrinę nervų sistemas, somatomotorinį aktyvumą ir elgseną. Kiekvieną savaitę reikėtų atlikti maisto įsisavinimo matavimus. Gyvūnai turėtų būti sveriami kas savaitę.

Skrodimas

Ir tyrimo metu nugaišę, ir išlikę išlikę gyvos veislinės patelės tyrimo pabaigoje turėtų būti ištiriamos makroskopiškai, siekiant rasti bet kokias struktūrines anomalijas arba patologinius pokyčius, kurie galėjo atsirasti dėl nėštumo. Iškart po nugaišimo pašalinama gimda ir tiriamas jos turinys, siekiant nustatyti embriono arba gemalo mirtį bei gyvų embrionų skaičių. Paprastai įmanoma nustatyti mirties laiką gimdoje, jei tai įvyko. Žiurkių bei triušių atveju galima nustatyti *corpora lutea* skaičių. Turėtų būti nustatyta gemalų lytis ir jie turėtų būti atskirai pasveriami, svoriai užrašomi ir apskaičiuotas vidutinis gemalo svoris. Po pašalinimo kiekvienas gemalas turėtų būti apžiūrimas iš išorės. Žiurkių, pelių ir žiurkėnų atveju 1/3–1/2 kiekvienos vados dalis turėtų būti paruošta ir ištirtos skeleto anomalijos bei likusi kiekvienos vados dalis turėtų būti paruošta ir, panaudojant atitinkamus metodus, turėtų būti ištirtos minkštojo audinio anomalijos. Triušių atveju, kiekvieno gemalo visceralinės (snukio) bei skeleto anomalijos turėtų būti kruopščiai ištirtos.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, patelių, kurios pastojo, skaičius, gyvų gemalų skaičius bei gemalų, turinčių minkštojo ar skeleto anomalijas, skaičius bei jų sąsajos su konkrečia vada. Rezultatai turėtų būti vertinami atitinkamu statistiniu metodu. Galima panaudoti bet kokį visuotinai pripažintą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,
— tyrimo sąlygos,
— dozės lygiai (įskaitant įrangą, jei ji naudota) ir koncentracijos,
— duomenys apie toksinį atsaką pagal duotą dozę,
— tai dozės lygis, kuriam esant jokių efektų nepastebėta (jei įmanoma),
— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,
— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,
— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių stebėjimo laikas,
— duomenys apie pašarą bei kūno masę,
— nėštumo trukmė ir duomenys apie vadą (įskaitant ankstesnius duomenis),
— duomenys apie gemalus (gyvas/miręs, lytis, minkštojo audinio ir skeleto defektai),
— duomenys apie vadą (gyvi/mirę jaunikliai, jų lytis, kiekvienos vados minkštojo audinio ir skeleto defektai),
— rezultatų statistinė analizė (jei įmanoma),
— rezultatų aptarimas,
— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

CHRONINIS TOKSIŠKUMO TESTAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Tiriamoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo tiriamąja medžiaga ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Prieš tyrimą mažiausiai 5 dienas gyvūnai yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

Tyrimo sąlygos

Eksperimentiniai gyvūnai

Labiausiai naudojama rūšis yra žiurkės. Remiantis anksčiau atliktų tyrimų duomenimis, gali būti naudojamos ir kitos (graužikų arba negraužikų) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių kamienų gyvūnų sveikus jauniklius ir medžiagos davimas doze turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų neviršyti ± 20 % kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis oralinis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze graužikams ir kartu naudojant kontrolinę grupę, reikėtų naudoti mažiausiai 40 gyvūnų (20 patelių ir 20 patinėlių). Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numarinimai numatomi iš anksto, tai tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numarinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių.

Negraužikų atveju priimtina, kad būtų naudojamas mažesnis gyvūnų skaičius, tačiau kiekvienoje grupėje turi būti mažiausiai po 4 kiekvienos lyties gyvūnus.

Dozė ir veikimo dažnumas

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios dozės naudojant kontrolinę grupę. Didžiausia dozė turėtų sukelti aiškiai pasireiškiantį toksiškumą, nesukeliant perteklinio mirtingumo. Mažiausia dozė neturėtų sukelti akivaizdaus toksiškumo.

Tarpinė dozė turėtų būti išdėstyta tarp aukščiausios ir žemiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo tyrimų ir testų duomenimis.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien. Jei cheminė medžiaga duodama sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti pastoviai prieinama.

Kontrolė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, identišką grupėms, kurios veikiamos, bet kuriuo aspektu, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip įkvėpimo tyrimai naudojant aerozolius arba oraliniai tyrimai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taipogi naudoti ir neigiamą kontrolinę grupę. Neigiama kontrolinė grupė veikiama tuo pačiu būdu kaip ir tiriamosios grupės, išskyrus tai, kad gyvūnai neveikiami jokia tiriamąja medžiaga nei prietaisu.

Davimo būdas

Duodama paprastai dviem būdais – per burną ir kvėpuojamąjį traktą. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo tiriamosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir panašaus veikimo būdo žmonių tarpe.

Duodant per odą susiduriama su didelėmis praktinio pobūdžio problemomis. Chroninis sisteminis toksiškumas, atsirandantis dėl poodinės absorbcijos, įprastiniu atveju gali įtakoti kito oralinio testo metu gaunamus duomenis ir gaunama daug informacijos apie poodinės absorbcijos, įvertintos, anksčiau atlikus poodinio toksiškumo testus, perteklių.

Oraliniai tyrimai

Jei tiriamoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės susiduria su tiriamąja medžiaga, tai pasirenkamas davimo per burną būdas, nebent nustatomos kontraindikacijos.

Gyvūnai gali gauti tiriamąją medžiagą su maistu, ištirpintą vandenyje arba su kapsule.

Geriausia, kad dozavimas būtų atliekamas septynis kartus per savaitę kasdien, nes dozuojant penkis kartus per savaitę gali paskatinti atsistatymą bei pašalinti toksiškumą tuo metu, kai nėra dozuojama ir šitai gali turėti įtakos gaunamiems rezultatams bei vėliau atliekamam jų įvertinimui. Tačiau pirmiausia, remiantis praktiniu patyrimu, rekomenduojama vykdyti dozavimą penkis kartus per savaitę.

Įkvėpimo tyrimai

Dėl to, kad įkvėpimo tyrimuose susiduriama su didesnėmis techninėmis problemomis nei duodant tiriamąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamas detalus vadovas, nurodantis kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją yra alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Atliekant ilgalaikius veikimus, paprastai remiamasi veikimu žmonių atžvilgiu, veikiant gyvūnus kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkiskart per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą aplinkos veikimą, veikiama 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (pastovus veikimas), vieną valandą per dieną šeriant kameroje laikomus gyvūnus tuo pačiu metu. Abiem atvejais gyvūnai pastoviai veikiami nustatytomis tiriamosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir pastoviojo veikimų skirtumas yra tai, kad protarpinis veikimas užtrunka 17–18 valandų, per kurias gyvūnai atsigauna po efektų, atsiradusių dėl kasdieninio veikimo, o šitai užtrunka žymiai ilgiau savaitgaliais.

Protarpinio ar pastoviojo veikimo pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslų bei nuo žmogaus veikimo, kuris turi būti imituojamas. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, pastoviojo veikimo teikiamų privalumų, imituojant aplinkos sąlygas, reikia atsisakyti, nes veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia sukurti žymiai sudėtingesnį (bei labiau patikimesnį) aerozolį ir garus bei imtis priežiūros.

Veikimo kamera

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirta įranga, suprojektuota taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Kontrolinė kamera bei toji, kurioje atliekamas veikimas turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos visais aspektais būtų užtikrintos, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad tiriamoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Tiriami gyvūnai kamerose turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros oro stabilumą, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio.

Reikėtų atlikti tokius matavimus arba priežiūrą:

i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti pastoviai prižiūrimas;

ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų peržengti ± 15 % vidutinės vertės;

iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju temperatūra turėtų būti palaikoma 22 ± 2 °C ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad tiriamoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų pastoviai stebėti temperatūrą bei drėgmę;

iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių, įskaitant skysčius ar kietuosius aerozolius, dydžius. Aerozolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas tiriamasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti įnešami į gyvūnų kvėpuojamąją zoną. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerozolius, esančius suspensijoje, netgi jei didžioji aerozolio dalis nėra įkvepiama. Dalelių dydį reikėtų nustatinėti kaip galima dažniau, kuriant sistemą tam, kad būtų užtikrintas aerozolio stabilumas ir po to kuo dažniau veikimų metu tam, kad būtų galima tinkamai nustatyti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą.

Tyrimo trukmė

Davimas turėtų trukti mažiausiai 12 mėnesių.

Procedūra

Stebėjimai

Detalus klinikinis tyrimas turėtų būti atliekamas vienąkart per dieną. Kasdien reikėtų atlikti papildomus stebėjimus ir imtis atitinkamų veiksmų sumažinti gyvūnų gaišimą tyrimo metu, pavyzdžiui, skrosti ar užšaldyti tuos gyvūnus, kurie buvo rasti nugaišę ir izoliuoti ar numarinti silpnus bei mirštančius gyvūnus. Reikėtų kruopščiai nustatyti toksinių efektų pasireiškimo laiką bei eigą, o taip pat sumažinti gyvūnų gaišimą dėl ligos, autolizės ar kanibalizmo.

Turėtų būti registruojami visų gyvūnų klinikiniai požymiai, įskaitant regos bei neurologinius pokyčius, o taip pat mirtingumas. Reikėtų registruoti ir toksinių sąlygų, įskaitant ir įtariamus auglius, pasireiškimo laiką bei eigą.

Pirmųjų trylikos tyrimo savaičių bėgyje kartą per savaitę reikėtų registruoti visų gyvūnų kūno masę ir po to vienąkart per savaitę kas mėnesį. Pirmųjų 13 tyrimo savaičių bėgyje kas savaitę reikėtų įvertinti pašaro įsisavinimą ir vėliau kas trys mėnesiai, nebent sveikatos būklė ar svoris verčia elgtis kitaip.

Hematologinis tyrimas

Reikėtų atlikti hematologinį tyrimą (pvz., nustatant hemoglobino kiekį, eritrocitų užimamą tūrį kraujyje absoliutų eritrocitų, leukocitų ir trombocitų skaičių arba kitus rodiklius kraujo krešėjimo aktyvumui įvertinti) praėjus trims, šešiems mėnesiams, o paskui kas pusę metų, surenkant kraujo mėginius iš visų negraužimų ir iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių žiurkių. Jei įmanoma, kraujo mėginiai imami iš tų pačių žiurkių tokiu pačiu laiko intervalu. Be to, iš negraužikų reikėtų paimti išankstinius mėginius tyrimui.

Jei, remiantis klinikiniais stebėjimais, spėjama, kad tyrimo metu sutriko gyvūnų sveikata, paveiktų gyvūnų kraujo analizė turėtų būti atliekama kitaip.

Gyvūnų, kuriems buvo duota didžiausia medžiagos dozė bei kontrolinės grupės individų kraujo mėginių analizė atliekama kitu būdu. Kitos grupės (ar grupių), kuriai (-ioms) buvo duota mažesnė dozė, kraujo analizė atliekama kitaip, jei tarp didžiausią dozę gavusios ir kontrolinės grupės egzistuoja pagrindinis skirtumas arba tai buvo nustatyta patologinių tyrimų metu.

Šlapimo analizė

Šlapimo mėginiai, turėtų būti paimti iš visų negraužimų ir iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų, jei įmanoma, tų pačių kaip ir hematologiniam tyrimui. Mėginiai, paimti arba iš atskirų gyvūnų, arba mėginių rinkinys, paimtas iš vienos lyties ar graužikų grupės, turėtų būti ištirti taip:

— išorė: individualaus gyvūno šlapimo tūris bei tankis,

— baltymų, gliukozės, ketonų, paslėpto kraujo kiekis (pusiau kiekybiškai),

— nuosėdų mikroskopinis vaizdas (pusiau kiekybiškai).

Klinikinė chemija

Maždaug kas šešis mėnesius ir tyrimo pabaigoje iš visų negraužikų bei 10 kiekvienos lyties ir visų grupių žiurkių, jei įmanoma, iš tų pačių žiurkių esant tam pačiam laiko tarpui, turėtų būti surenkami kraujo mėginiai, kad vėliau būtų ištirti klinikinės chemijos aspektu. Be to„ iš visų negraužikų turėtų būti paimami išankstiniai mėginiai. Paėmus mėginius, paruošiama plazma ir atliekami tokie matavimai:

— absoliuti baltymo koncentracija,

— albumino koncentracija,

— kepenų funkciniai testai (tokie kaip šarminės fosfatazės aktyvumo nustatymo testas, glutamino piruvato transaminazės [1] aktyvumo nustatymo testas ir glutamato oksal acetato transaminazės [2] aktyvumo nustatymo testas), γ glutamiltranspeptidazė, ornitino dekarboksilazė,

— angliavandenių metabolizmas, įvertinant gliukozės kraujyje trūkumą,

— inkstų funkciniai testai, tokie kaip šlapalo nustatymas kraujyje.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, įskaitant tuos kurie nugaišo eksperimentų metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie miršta. Prieš numarinimą turėtų būti paimti visų gyvūnų kraujo mėginiai tam, kad būtų atlikta diferencinė kraujo analizė. Visi akivaizdžiai matomi sutrikimai, augliai ar sutrikimai, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai, turėtų būti užkonservuoti. Reikėtų stengtis rasti sąsajas tarp pagrindinių stebėjimų ir mikroskopinių analizių.

Histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi tokie audiniai ir organai: smegenys [3] (pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūviai, smegenėlių ir smegenų žievės), hipofizė, tiroidinė liauka (įskaitant paratiroidinę liauką), užkrūčio liauka, plaučiai (įskaitant trachėją), širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys [3], blužnis, inkstai [3], antinksčiai [3], stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, gimda, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos [3], pagalbiniai lytiniai organai, moterų pieno liauka, oda, raumenynas, periferinis nervas, stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens), krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis (įskaitant ir segmentinį paviršių) bei akys. Plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas įkvėpimo tyrimuose yra svarbus atitinkamų histopatologinių tyrimų aspektu. Ypatingų tyrimų, tokių, kaip įkvėpimo tyrimai, atveju, reikėtų tirti visą kvėpuojamąjį traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklas ir ryklę.

Jei atliekami kiti klinikiniai tyrimai, tai šių procedūrų metu gauta informacija turėtų būti prieinama, atliekant mikroskopinę analizę, nes ta informacija yra pagrindinė patologo darbo gairė.

Histopatologinis tyrimas

Visi akivaizdūs pokyčiai, ypač bet kurio organo augliai ir kiti sutrikimai, turėtų būti tiriami mikroskopiškai. Be to, rekomenduojama atlikti tokias procedūras:

a) visų užkonservuotų organų ir audinių mikroskopinę analizę, visapusiškai apibūdinant sutrikimus, rastus:

   1) visuose gyvūnuose, kurie nugaišo arba buvo numarinti tyrimo metu;

   2) visuose tiriamosios grupės, kuriai buvo duota didelė medžiagos dozė, bei kontrolinės grupės gyvūnuose;

b) organai arba audiniai, kurių anomalijas sukėlė arba galėjo sukelti tiriamoji medžiaga, taipogi tiriami grupės, gavusios mažą dozę, gyvūnuose;

c) jei tyrimo metu gautas rezultatas įrodo, kad gyvūnų gyvenimo normali trukmė ypač sutrumpėjo arba atsirado efektai, galintys turėti įtakos toksiniam atsakui, tai sekanti dozė turėtų būti tiriama taip, kaip aprašyta aukščiau;

d) manoma, kad informacija apie sutrikimų, įprastiniu atveju pasitaikančių tiriamųjų gyvūnų kamiene, dažnumą laboratorinėmis sąlygomis (pvz., remiantis anksčiau atliktų tyrimų duomenimis) yra būtina teisingai įvertinant pokyčių gyvūnuose, paveiktuose tiriamąja medžiaga, reikšmę.

---

[1] Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.
[2] Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.
[3] Šie organai, paimti iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų bei visų negraužikų, taip pat visų negraužikų skydliaukė (su prieskydine liauka) turėtų būti pasverti.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti apibendrinti pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pakitimai, skaičius, pakitimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pakitimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokį visuotinai vartojamą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Jei įmanoma, tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas:

įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerozolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerozolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumą.

Veikimo metu gauti duomenys:

duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greitį;

b) oro temperatūrą ir drėgmę;

c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpimo įrangoje esančios tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);

d) tirpiklio, jei jis naudojamas, tipą;

e) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoje kvėpuojamoje zonoje;

f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti),

— dozių dydžiai (įskaitant tirpiklį, jei naudojamas) ir koncentracijos vertės,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— nestebimo poveikio dozės dydis,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,

— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių, pastebėjimo momentas,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,

— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) duomenys,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

KARCINOGENIŠKUMO TESTAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Tiriamoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo tiriamąja medžiaga metu ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius, ypač auglių vystymąsi.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

Eksperimentiniai gyvūnai

Remiantis anksčiau atliktų tyrimų rezultatais, gali būti naudojamos kitos (graužikų arba negraužikų) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių kamienų gyvūnų sveikus jauniklius, medžiagos davimas doze turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų siekti ± 20 % kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis oralinis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze graužikams ir kartu naudojant kontrolinę grupę, reikėtų naudoti mažiausiai 100 gyvūnų (50 patelių ir 50 patinėlių). Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numarinimai numatomi iš anksto, tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numarinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių.

Dozė ir veikimo dažnumas

Turėtų būti naudojamos mažiausiai 3 tiriamosios dozės naudojant kontrolinę grupę. Didžiausia dozė turėtų sukelti minimalų toksiškumą, pasireiškiantį nežymiu kūno masės priaugimo sumažėjimu (mažesniu nei 10 %), iš esmės nepakeičiant įprastinės gyvenimo trukmės dėl efektų, kurie skiriasi nuo auglių atsiradimo.

Mažiausia dozė neturėtų trikdyti gyvūno normalaus augimo, vystymosi bei gyvenimo trukmės ar sukelti toksiškumo. Apskritai, ši dozė neturėtų būti mažesnė nei didelės dozės dešimtoji dalis (10 %).

Tarpinė dozė turėtų būti išdėstyta tarp aukščiausios ir žemiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo testų ir tyrimų duomenimis.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien. Jei cheminė medžiaga duodama sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti pastoviai prieinama.

Kontrolė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, identišką grupėms, kurios veikiamos, bet kuriuo aspektu, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip įkvėpimo tyrimai naudojant aerozolius arba oraliniai tyrimai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taipogi naudoti ir neigiamą kontrolinę grupę. Neigiama kontrolinė grupė veikiama tuo pačiu būdu kaip ir tiriamosios grupės, išskyrus tai, kad gyvūnai neveikiami jokia tiriamąja medžiaga nei prietaisu.

Davimo būdas

Duodama paprastai trimis būdais – per burną, odą ir kvėpuojamąjį traktą. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo tiriamosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir panašaus veikimo būdo žmonių tarpe.

Oraliniai tyrimai

Jei tiriamoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės susiduria su tiriamąja medžiaga, tai pasirenkamas davimo per burną būdas, nebent nustatomos kontraindikacijos. Gyvūnai gali gauti tiriamąją medžiagą su maistu, ištirpintą vandenyje arba su kapsule.

Geriausia, kad dozavimas būtų atliekamas septynis kartus per savaitę kasdien, nes dozavimas penkis kartus per savaitę gali paskatinti atsistatymą bei pašalinti toksiškumą tuo metu, kai nėra dozuojama ir šitai gali turėti įtakos gaunamiems rezultatams bei vėliau atliekamam jų įvertinimui. Tačiau pirmiausia remiantis praktiniu patyrimu, rekomenduojama vykdyti dozavimą penkis kartus per savaitę.

Odos tyrimai

Odos veikimas jos nudažymu gali būti pasirinktas kaip pagrindinio būdo, kuriuo veikiami žmonės imitacija bei kaip odos sutrikimų sukėlimo modelinė sistema.

Įkvėpimo tyrimai

Dėl to, kad įkvėpimo tyrimuose susiduriam su didesnėmis techninėmis problemomis, nei duodant tiriamąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamas detalus vadovas, nurodantis, kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją yra alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Atliekant ilgalaikius veikimus, paprastai remiamasi veikimu žmonių atžvilgiu, veikiant gyvūnus kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkiskart per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą aplinkos veikimą, veikiama 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (pastovus veikimas), vieną valandą per dieną šeriant kameroje laikomus gyvūnus tuo pačiu metu. Abiem atvejais gyvūnai pastoviai veikiami nustatytomis tiriamosios medžiagos koncentracijomis.

Pagrindinis protarpinio ir pastoviojo veikimų skirtumas yra tai, kad protarpinis veikimas užtrunka 17–18 valandų, per kurias gyvūnai atsigauna po efektų, atsiradusių dėl kasdieninio veikimo, o šitai užtrunka žymiai ilgiau savaitgaliais.

Protarpinio ar pastoviojo veikimo pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslų bei nuo žmogaus veikimo, kuris turi būti imituojamas. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, pastoviojo veikimo teikiamų privalumų, imituojant aplinkos sąlygas, reikia atsisakyti, nes veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia sukurti žymiai sudėtingesnį (bei labiau patikimesnį) aerozolį ir garus, bei imtis priežiūros.

Veikimo kamera

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirta įranga, suprojektuota taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Kontrolinė kamera bei toji, kurioje atliekamas veikimas turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos visais aspektais būtų užtikrintos, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad tiriamoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Tiriami gyvūnai kamerose turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros oro stabilumą, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio.

Reikėtų atlikti tokius matavimus arba priežiūrą:

i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti pastoviai prižiūrimas;

ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų peržengti ± 15 % vidutinės vertės. Viso tyrimo laikotarpiu reikėtų išlaikyti kasdienines koncentracijas, jei tai praktiškai įmanoma padaryti;

iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju temperatūra turėtų būti palaikoma apie 22 ± 2 °C ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad tiriamoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų pastoviai stebėti temperatūrą bei drėgmę;

iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių, įskaitant skysčius ar kietuosius aerozolius, dydžius. Aerozolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas tiriamasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti įnešami į gyvūnų kvėpuojamąją zoną. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerozolius, esančius suspensijoje, netgi jei didžioji aerozolio dalis nėra įkvepiama. Dalelių dydį reikėtų nustatinėti kaip galima dažniau, kuriant sistemą tam, kad būtų užtikrintas aerozolio stabilumas ir po to kuo dažniau veikimų metu tam, kad būtų galima tinkamai nustatyti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą.

Tyrimo trukmė

Karcinogeniškumo testas trunka didžiąją tiriamųjų gyvūnų gyvenimo dalį. Pelių ir žiurkėnų atveju tyrimą reikėtų baigti po 18 mėnesių, o žiurkių atveju – po vienerių metų; tačiau konkrečių gyvūnų kamienų, kurių gyvenimo trukmė yra ilgesnė ir (ar) esant lėtam auglių vystymuisi, atveju, tyrimą reikėtų baigti po vienerių metų (pelės ir žiurkėnai) bei po 30 mėnesių (žiurkės). Priešingu atveju, toks pratęstas tyrimas baigiamas, jei gyvūnų, priklausančių kontrolinei bei mažiausios dozės grupėms, skaičius siekia 25 %. Jei užbaigiamas testas, kurio metu buvo nustatytas aiškus lyčių skirtumas pagal atsaką, kiekviena lytis apsvarstoma atskirai. Jei dėl akivaizdžių toksiškumo priežasčių miršta grupė, gavusi didelę dozę, nebūtina baigti tyrimą, pasireiškiant toksinėms reakcijoms, kurios nesukelia problemų kitoms tiriamosioms grupėms. Neigiamas testo rezultatas priimtinas tada, kai ne daugiau kaip 10 % bet kurios grupės gyvūnų nugaišta eksperimento metu dėl autolizės, kanibalizmo ar laikymo sąlygų ir po 18 mėnesių išlieka ne mažiau kaip 50 % visų grupių pelių bei po vienerių metų – ne mažiau kaip 50 % visų grupių žiurkėnų.

Procedūra

Stebėjimai

Kasdien reikėtų atlikti narveliuose laikomų gyvūnų odos ir kailio, akių bei gleivinių membranų, o taipogi kvėpuojamojo trakto, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemų, somatomotorinio ir elgsenos pakitimų stebėjimus.

Reguliariai atliekami gyvūnų stebėjimai yra būtini, kaip galima labiau užtikrinant, kad gyvūnai nenugaištų tyrimo metu dėl tokių priežasčių, kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei vietos pakeitimas. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinti ir, jei nurodyta, skrodžiami.

Reikėtų registruoti visų gyvūnų klinikinius požymius bei mirtingumą. Ypatingas dėmesys turi būti skiriamas auglių vystymuisi: turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo bei užčiuopiamo auglio pasireiškimo laikas, vieta, dydis ir išorė.

Pirmąsias 13 tyrimo savaičių reikėtų nustatyti pašaro (ir vandens, jei tiriamoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) įsisavinimą ir vėliau tai daryti maždaug kas trys mėnesiai, nebent sveikatos būklė ar kūno masės pokyčiai verčia elgtis kitaip.

Pirmąsias 13 tyrimo savaičių bent vienąkart per mėnesį reikėtų pasvert visus gyvūnus.

Klinikiniai tyrimai

Hematologinis tyrimas

Jei, remiantis laikomų narveliuose gyvūnų stebėjimais, spėjama, kad tyrimo metu sutriko gyvūnų sveikata, turi būti atliekama gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, diferencinė kraujo analizė.

Praėjus vieneriems metams bei 18 mėnesių iš gyvūnų paimami kraujo tepinėliai. Kraujo diferencinė analizė atliekama gyvūnų, gavusių didžiausią medžiagos dozę bei kontrolinės grupės gyvūnų atveju. Jei šie duomenys, ypač tie, kurie buvo gauti prieš numarinimą arba patologinių tyrimų duomenys rodo, kad reikia ištirti kraują, tai atliekama grupės, gavusios mažesnę dozę, diferencinė kraujo analizė.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, įskaitant tuos kurie nugaišo eksperimentų metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie miršta. Visi akivaizdžiai matomi augliai ar sutrikimai, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai, turėtų būti užkonservuoti.

Histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi, laikant atitinkamoje terpėje, tokie audiniai ir organai: smegenys (pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūviai, smegenėlių ir smegenų žievė), hipofizė, tiroidinė/paratiroidinė liauka, užkrūčio liaukos audinys, plaučiai ir trachėja, širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys, blužnis, inkstai, antinksčiai, stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna, gimda, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos, pagalbiniai lytiniai organai, moterų pieno liauka, oda, raumenynas, periferinis nervas, stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens), krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis, (įskaitant ir segmentinį paviršių) ir akys.

Plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas įkvėpimo tyrimuose yra svarbus atitinkamų histopatologinių tyrimų aspektu. Įkvėpimo tyrimų atveju, reikėtų išsaugoti visą kvėpuojamąjį traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklas ir ryklę.

Histopatologinis tyrimas

a) Reikėtų atlikti visų gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti tyrimo metu, o taipogi visų kontrolinės bei gavusios didelę dozę grupių gyvūnų pilną histopatologinę analizę.

b) Reikėtų mikroskopiškai ištirti visose grupėse akivaizdžiai matomus auglius ar sutrikimus, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai.

c) Jei gavusios didelę dozę ir kontrolinė grupės skiriasi pagal neoplastinių sutrikimų pasireiškimą, tai reikėtų ištirti konkrečius šių grupių organus ar audinius.

d) Jei gavusios didelę dozę grupės gyvūnų išgyvenamumas ypač skiriasi nuo kontrolinės grupės, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę.

e) Jei egzistuoja įrodymai, kad toksiniai ar kiti efektai galėjo sukelti neoplastinį atsaką grupėje, gavusioje didelę dozę, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti augliai tyrimo metu, jų nustatymo laikas bei gyvūnų, kuriuose buvo nustatyti augliai numarinimo metu. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokį statistinį metodą, vartojamą visuotinu mastu.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas:

įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerozolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerozolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumą.

Veikimo metu gauti duomenys:

duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greičius;

b) oro temperatūrą ir drėgmę;

c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpimo įrangoje esančios tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);

d) prietaiso, jei jis naudojamas, pobūdį;

e) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoje kvėpuojamoje zonoje;

f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— jei įmanoma, duomenų lygis, kuriam esant, jokių efektų nebuvo pastebėta,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo,

— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių, pastebėjimo momentas,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

KOMBINUOTAS CHRONINIO TOKSIŠKUMO/KARCINOGENIŠKUMO TESTAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Kombinuoto chroninio toksiškumo/karcinogeniškumo testo tikslas yra nustatyti medžiagos, kuria žinduoliai veikiami ilgiau nei įprasta, chroninius ir karcinogeninius efektus.

Tuo tikslu karcinogeninio testo metu naudojama mažiausiai viena papildoma, tiriamąja medžiaga veikiama, bei kontrolinė grupė. Dozė, kuri duodama papildomai grupei, veikiamai didele doze, yra didesnė, nei ta, kuri duodama grupei karcinogeniškumo testo metu. Karcinogeniškumo testo metu tiriamas tiek bendras gyvūnų toksiškumas, tiek ir atsakas į karcinigeną. Papildomos grupės, veikiamos tiriamąja medžiaga gyvūnai tiriami bendrojo toksiškumo aspektu.

Tiriamoji medžiaga paprastai duodama septynis kartus per savaitę atitinkamu būdu keletui eksperimentinių gyvūnų grupių, vieną dozę duodant vienai grupei didžiąją gyvūnų gyvenimo dalį. Veikimo tiriamąja medžiaga metu ir jam pasibaigus eksperimentiniai gyvūnai stebimi kasdien, siekiant nustatyti toksiškumo požymius bei auglių vystymąsi.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Prieš tyrimą gyvūnai mažiausiai 5 dienas yra laikomi ir šeriami eksperimentinėje fermoje. Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes.

Eksperimentiniai gyvūnai

Labiausiai naudojama rūšis yra žiurkės. Remiantis anksčiau atliktų tyrimų duomenimis, gali būti naudojamos ir kitos (graužikai arba negraužikai) rūšys. Reikėtų naudoti įprastinių laboratorinių kamienų gyvūnų sveikus jauniklius, medžiagos davimas doze turėtų prasidėti iškart po atjunkymo.

Tyrimo pradžioje kūno masės variacijos ribos turėtų siekti ± 20 % kūno masės vidurkio. Jei prieš ilgalaikį tyrimą yra atliekamas pusiau chroninis oralinis tyrimas, tai abiejų tyrimų metu reikėtų naudoti tos pačios rūšies ar kamieno gyvūnus.

Skaičius ir lytis

Duodant medžiagą skirtinga doze graužikams ir kartu naudojant kontrolinę grupę, reikėtų naudoti mažiausiai 100 gyvūnų (50 patelių ir 50 patinėlių). Patelės turi būti negimdžiusios ir ne nėščios. Jei numarinimai numatomi iš anksto, tiriamų gyvūnų skaičius padidinamas padidinant gyvūnų, kuriuos numatoma numarinti prieš užbaigiant tyrimą, skaičių.

Papildomoje grupėje, skirtoje patologiniam tyrimui bei veikiamoje tiriamąja medžiaga, turėtų būti po 20 kiekvienos lyties gyvūnų, tuo tarpu kai papildomoje kontrolinėje grupėje turėtų būti po 10 kiekvienos lyties gyvūnų.

Dozė ir veikimo dažnis

Tam, kad būtų įvertintas karcinogeniškumas, reikėtų naudoti mažiausiai 3 tiriamąsios dozes, naudojant kontrolinę grupę. Didžiausia dozė turėtų sukelti minimalų toksiškumą, pasireiškiantį nežymiu kūno masės priaugimo sumažėjimu (mažiau nei 10 %), nepakeičiant iš esmės normalios gyvenimo trukmės dėl kitų efektų, besiskiriančių nuo auglių.

Mažiausia dozė neturėtų trukdyti normaliam gyvūno augimui, vystymuisi ar gyvenimo trukmei ar sukelti toksiškumo. Apskritai, ši dozė turi būti ne mažesnė kaip dešimtoji (10 %) didelės dozės dalis.

Tarpinė dozė turėtų būti išdėstyta tarp didžiausios ir mažiausios dozių.

Pasirenkant dozes reikėtų remtis anksčiau atliktų toksiškumo tyrimų ir testų duomenimis.

Atliekant chroninio toksiškumo testą, naudojamos papildomos, veikiamos tiriamąja medžiaga bei kontrolinės grupės. Didelė dozė, duodama papildomos tiriamosios grupės gyvūnams, turėtų sukelti konkrečius toksiškumo požymius.

Veikimas turėtų būti atliekamas kasdien. Jei cheminė medžiaga duodama, sumaišius ją su vandeniu ar pašaru, ji turėtų būti pastoviai prieinama.

Kontrolė

Kartu reikėtų naudoti kontrolinę grupę, identišką grupėms, kurios veikiamos, bet kuriuo aspektu, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga.

Ypatingais atvejais, tokiais kaip įkvėpimo tyrimai naudojant aerozolius arba oraliniai tyrimai naudojant nežinomo biologinio aktyvumo emulsiklius, reikėtų taipogi naudoti papildomą kontrolinę grupę, neveikiamą prietaisu.

Davimo būdas

Duodama paprastai trimis būdais – per burną, odą ir kvėpuojamąjį traktą. Davimo būdo pasirinkimas priklauso nuo tiriamosios medžiagos fizikinių ir cheminių ypatybių ir panašaus veikimo būdo žmonių tarpe.

Oraliniai tyrimai

Jei tiriamoji medžiaga absorbuojama iš virškinamojo trakto ir jei šis įsisavinimo būdas yra vienas iš būdų, kuriuo žmonės susiduria su tiriamąja medžiaga, tai pasirenkamas davimo per burną būdas, nebent nustatomos kontraindikacijos. Gyvūnai gali gauti tiriamąją medžiagą su maistu, ištirpintą vandenyje arba su kapsule. Geriausia, kad dozavimas būtų atliekamas septynis kartus per savaitę kasdien, nes dozavimas penkis kartus per savaitę gali paskatinti atsistatymą bei pašalinti toksiškumą tuo metu, kai nėra dozuojama, o tai gali turėti įtakos gaunamiems rezultatams bei vėliau atliekamam jų įvertinimui. Tačiau pirmiausia remiantis praktiniu patyrimu, rekomenduojama vykdyti dozavimą penkis kartus per savaitę.

Odos tyrimai

Odos veikimas jos nudažymu gali būti pasirinktas kaip pagrindinio būdo, kuriuo veikiami žmonės imitacija bei kaip odos sutrikimų sukėlimo modelinė sistema.

Įkvėpimo tyrimai

Dėl to, kad įkvėpimo tyrimuose susiduriama su didesnėmis techninėmis problemomis, nei duodant tiriamąją medžiagą kitais būdais, čia pateikiamas detalus vadovas, nurodantis, kaip duoti medžiagą šiuo būdu. Reikėtų pažymėti, kad ypatingų situacijų atveju lašinimas į trachėją yra alternatyvus problemos sprendimo būdas.

Atliekant ilgalaikius veikimus, paprastai remiamasi veikimu žmonių atžvilgiu, veikiant gyvūnus kasdien šešias valandas po to, kai suvienodinamos koncentracijos kameros viduje, penkiskart per savaitę (protarpinis veikimas) arba, atsižvelgiant į galimą aplinkos veikimą, veikiama 22–24 valandas per dieną septynis kartus per savaitę (pastovus veikimas), vieną valandą per dieną šeriant kameroje laikomus gyvūnus tuo pačiu metu. Abiem atvejais gyvūnai pastoviai veikiami nustatytomis tiriamosios medžiagos koncentracijomis. Pagrindinis protarpinio ir pastoviojo veikimų skirtumas yra tai, kad protarpinis veikimas užtrunka 17–18 valandų, per kurias gyvūnai atsigauna po efektų, atsiradusių dėl kasdieninio veikimo, o šitai užtrunka žymiai ilgiau savaitgaliais.

Protarpinio ar pastoviojo veikimo pasirinkimas priklauso nuo tyrimo tikslų bei nuo žmogaus veikimo, kuris turi būti imituojamas. Tačiau reikia apsvarstyti ir konkrečius techninius sunkumus. Pavyzdžiui, pastoviojo veikimo teikiamų privalumų, imituojant aplinkos sąlygas, reikia atsisakyti, nes veikimo metu gyvūnus reikia šerti ir girdyti ir dėl to, kad reikia sukurti žymiai sudėtingesnį (bei labiau patikimesnį) aerozolį ir garus bei imtis priežiūros.

Veikimo kamera

Gyvūnai turėtų būti tiriami įkvėpimo tyrimui skirta įranga, suprojektuota taip, kad palaikytų pastovų dinaminį oro srautą vykstant mažiausiai 12 oro pasikeitimų per valandą tam, kad užtikrintų tinkamą deguonies koncentraciją anksčiau pasiskirsčiusiame ore, kuriuo veikiama. Kontrolinė kamera bei toji, kurioje atliekamas veikimas turėtų būti identiškos pagal konstrukciją ir modelį tam, kad veikimo sąlygos visais aspektais būtų užtikrintos, išskyrus veikimą tiriamąja medžiaga. Nežymus neigiamas slėgis kameros viduje paprastai palaikomas tam, kad tiriamoji medžiaga nepatektų į supančią aplinką. Tiriami gyvūnai kamerose turėtų būti nesusigrūdę. Siekiant užtikrinti kameros atmosferos stabilumą, tūris, kurį užima tiriamieji gyvūnai, neturėtų viršyti 5 % tyrimui naudojamos kameros tūrio.

Reikėtų atlikti tokius matavimus arba priežiūrą:

i) oro srautas: oro srauto, patenkančio per kamerą, greitis turi būti pastoviai prižiūrimas;

ii) koncentracija: kasdieninio veikimo metu tiriamosios medžiagos koncentracija neturėtų peržengti ± 15 % vidutinės vertės. Viso tyrimo laikotarpiu reikėtų stengtis, kad koncentracijos būtų palaikomos kaip galima labiau pastovios kiekvieną dieną, jei tai įmanoma praktiškai;

iii) temperatūra ir drėgmė: graužikų atveju temperatūra turėtų būti palaikoma 22 ± 2 °C ir drėgmė kameroje turėtų siekti nuo 30 % iki 70 %, išskyrus tą atvejį, kai naudojamas vanduo tam, kad tiriamoji medžiaga virstų suspensija kameros atmosferoje. Reikėtų pastoviai stebėti temperatūrą bei drėgmę;

iv) dalelių dydžio matavimai: reikėtų nustatyti kameros atmosferoje esančių dalelių, įskaitant skysčius ar kietuosius aerozolius, dydžius. Aerozolių dalelės turėtų būti tokio dydžio, kad naudojamas tiriamasis gyvūnas jas galėtų įkvėpti. Kameros atmosferos mėginiai turėtų būti įnešami į gyvūnų kvėpuojamąją zoną. Oro mėginys, remiantis gravimetrine analize, turėtų atspindėti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą ir visus aerozolius, esančius suspensijoje, netgi jei didžioji aerozolio dalis nėra įkvepiama. Dalelių dydį reikėtų nustatinėti kaip galima dažniau, kuriant sistemą tam, kad būtų užtikrintas aerozolio stabilumas ir po to kuo dažniau veikimų metu tam, kad būtų galima tinkamai nustatyti dalelių, kuriomis gyvūnai veikiami, pasiskirstymą.

Tyrimo trukmė

Karcinogeniškumo testas trunka didžiąją tiriamųjų gyvūnų gyvenimo dalį. Pelių ir žiurkėnų atveju tyrimą reikėtų baigti po 18 mėnesių, o žiurkių atveju – po vienerių metų; tačiau konkrečių gyvūnų kamienų, kurių gyvenimo trukmė yra ilgesnė ir (ar) esant lėtam auglių vystymuisi, atveju, tyrimą reikėtų baigti po vienerių metų (pelės ir žiurkėnai) bei po 30 mėnesių (žiurkės). Priešingu atveju, toks pratęstas tyrimas baigiamas, jei gyvūnų, priklausančių kontrolinei bei mažiausios dozės grupėms, skaičius siekia 25 %. Jei užbaigiamas testas, kurio metu buvo nustatytas aiškus lyčių skirtumas pagal atsaką, kiekviena lytis apsvarstoma atskirai. Jei dėl akivaizdžių toksiškumo priežasčių miršta grupė, gavusi didelę dozę, nebūtina baigti tyrimą, pasireiškiant toksinėms reakcijoms, kurios nesukelia problemų kitoms tiriamosioms grupėms. Neigiamas testo rezultatas priimtinas tada, kai ne daugiau kaip 10 % bet kurios grupės gyvūnų nugaišta eksperimento metu dėl autolizės, kanibalizmo ar laikymo sąlygų ir po 18 mėnesių išlieka ne mažiau kaip 50 % visų grupių pelių bei žiurkėnų, po 24 mėnesių – ne mažiau kaip 50 % žiurkių.

Atliekant chroninio toksiškumo testą, mažiausiai metus naudojamos papildomos grupės, veikiamos tiriamąja medžiaga ir sudarytos iš 20 kiekvienos lyties gyvūnų bei kontrolinės grupės, sudarytos iš 10 kiekvienos lyties gyvūnų. Turėtų būti numatytas gyvūnų numarinimas, kad būtų galima tirti tiriamosios medžiagos sukeltus patologinius procesus, kuriems neturi įtakos gyvūnų senėjimas.

Procedūra

Stebėjimai

Kasdien reikėtų atlikti narveliuose laikomų gyvūnų odos ir kailio, akių bei gleivinių membranų, o taipogi kvėpuojamojo trakto, apytakos, autonominės bei centrinės nervų sistemų, somatomotorinio ir elgsenos pakitimų stebėjimus.

Reikėtų atitinkamais laiko tarpais atlikti papildomų tiriamųjų grupių gyvūnų klinikinį tyrimą.

Reguliariai atliekami gyvūnų stebėjimai yra būtini, kaip galima labiau užtikrinant, kad gyvūnai nenugaištų tyrimo metu dėl tokių priežasčių, kaip kanibalizmas, audinių autolizė bei vietos pakeitimas. Nugaišę gyvūnai turėtų būti pašalinti ir skrodžiami, jei nurodyta.

Reikėtų registruoti visų gyvūnų klinikinius požymius bei mirtingumą. Ypatingas dėmesys turi būti skiriamas auglių vystymuisi: turėtų būti registruojamas kiekvieno akivaizdžiai matomo bei užčiuopiamo auglio pasireiškimo laikas, vieta, dydis ir išorė; reikėtų registruoti toksinių sąlygų pasireiškimo laiką bei eigą.

Pirmąsias 13 tyrimo savaičių reikėtų nustatyti pašaro (ir vandens, jei tiriamoji medžiaga duodama su geriamuoju vandeniu) įsisavinimą ir vėliau tai daryti maždaug kas trys mėnesiai, nebent sveikatos būklė ar kūno masės pokyčiai verčia elgtis kitaip.

Pirmąsias 13 tyrimo savaičių bent vienąkart per savaitę, o vėliau – bent kartą per mėnesį reikėtų pasverti visus gyvūnus.

Klinikiniai tyrimai

Hematologinis tyrimas

Praėjus trims, šešiems mėnesiams, o paskui kas pusę metų ir surinkus kraujo mėginius iš kiekvienos grupės dešimties kiekvienos lyties žiurkių, reikėtų atlikti hematologinį tyrimą (nustatant hemoglobino kiekį, eritrocitų užimamą tūrį kraujyje absoliutų eritrocitų, leukocitų ir trombocitų skaičių arba kitus rodiklius kraujo krešėjimo aktyvumui įvertinti). Jei įmanoma, tai kraujo mėginiai imami iš tų pačių žiurkių tokiu pačiu laiko tarpu.

Jei, remiantis laikomų narveliuose gyvūnų stebėjimais, spėjama, kad tyrimo metu sutriko gyvūnų sveikata, reikėtų atlikti diferencinę gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, kraujo analizę.

Atliekama diferencinė gyvūnų, kuriems buvo duota didžiausia medžiagos dozė, bei kontrolinės grupės individų kraujo analizė. Kitos grupės (ar grupių), kuriai (-ioms) buvo duota mažesnė dozė, diferencinė kraujo analizė atliekama, jei egzistuoja pagrindinis skirtumas tarp didžiausią dozę gavusios ir kontrolinės grupės arba tai buvo nustatyta patologinių tyrimų metu.

Šlapimo analizė

Reikėtų surinkti šlapimo mėginius iš kiekvienoje grupėje esančių 10 kiekvienos lyties žiurkių, jei įmanoma, surenkant iš tų pačių žiurkių tais pačiais laiko tarpais, kaip tai buvo atliekama hematologinių tyrimų metu. Reikėtų atlikti kiekvieno gyvūno arba mėginių rinkinio, arba vienos lyties gyvūnų, esančių, vienoje graužikų grupėje, tokius tyrimus:

— išvaizda: individualaus gyvūno šlapimo tūris bei tankumas,

— baltymų, gliukozės, ketonų,paslėpto kraujo kiekis (pusiau kiekybiškai),

— nuosėdų mikroskopinis vaizdas (pusiau kiekybiškai).

Klinikinė chemija

Maždaug kas šešis mėnesius ir tyrimo pabaigoje iš visų negraužikų bei 10 kiekvienos lyties ir visų grupių žiurkių, jei įmanoma, iš tų pačių žiurkių esant tam pačiam laiko tarpui, turėtų būti surenkami kraujo mėginiai, kad vėliau būtų ištirti klinikinės chemijos aspektu. Paėmus mėginius, paruošiama plazma ir atliekami tokie matavimai:

— absoliuti baltymo koncentracija,

— albumino koncentracija,

— kepenų funkciniai testai (tokie kaip šarminės fosfatazės aktyvumo nustatymo testas, glutamino piruvato transaminazės ([1]) aktyvumo nustatymo testas ir glutamato oksal acetato transaminazės ([2]) aktyvumo nustatymo testas), γ glutamiltranspeptidazė, ornitino dekarboksilazė,

— angliavandenių metabolizmas, įvertinant gliukozės kraujyje trūkumą,

— inkstų funkciniai testai, tokie kaip šlapalo nustatymas kraujyje.

([1]) Dabar žinoma kaip serumo alaninamino transferazė.
([2]) Dabar žinoma kaip serumo aspartamino transferazė.

Pagrindinis skrodimas

Turėtų būti atliktas visapusiškas bendras visų gyvūnų skrodimas, įskaitant tuos, kurie nugaišo eksperimentų metu arba buvo numarinti tada, kai buvo nustatyta, jog jie miršta. Prieš numarinimą turėtų būti paimti visų gyvūnų kraujo mėginiai tam, kad būtų atlikta diferencinė kraujo analizė. Visi akivaizdžiai matomi sutrikimai, augliai ar sutrikimai, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai, turėtų būti užkonservuoti. Reikėtų stengtis rasti sąsajas tarp pagrindinių stebėjimų ir mikroskopinių analizių.

Histopatologiniams tyrimams turėtų būti išsaugomi visi audiniai ir organai, tokie kaip: smegenys ([1]) (pailgųjų smegenų/smegenų tilto pjūviai, smegenėlių ir smegenų žievės), hipofizė, tiroidinė liauka (įskaitant paratiroidinę liauką), užkrūčio liaukos audinys, plaučiai (įskaitant trachėją), širdis, aorta, seilių liaukos, kepenys ([1]), blužnis, inkstai ([1]), antinksčiai ([1]), stemplė, skrandis, dvylikapirštė žarna, tuščioji žarna, klubinė žarna, akloji žarna, tiesioji žarna, riestoji žarna,gimda, šlapimo pūslė, limfmazgiai, kasa, lytinės liaukos ([1]), pagalbiniai lytiniai organai, moterų pieno liauka, oda, raumenynas, periferinis nervas, stuburo smegenys (sprando, krūtinės ląstos ir juosmens), krūtinkaulis su kaulų čiulpais, šlaunikaulis (įskaitant sąnarį) ir akys.

Nors plaučių ir šlapimo pūslės pripildymas fiksuojančiąja medžiaga yra optimalus būdas išsaugoti šiuos audinius; plaučių pripildymas įkvėpimo tyrimuose yra svarbus atitinkamų histopatologinių tyrimų aspektu. Ypatingų tyrimų, tokių, kaip įkvėpimo tyrimai, atveju, reikėtų tirti visą kvėpuojamąjį traktą, įskaitant nosies ertmę, gerklas ir ryklę.

Jei atliekami kiti klinikiniai tyrimai, tai šių procedūrų metu gauta informacija turėtų būti prieinama, atliekant mikroskopinę analizę, nes ta informacija yra pagrindinė patologo darbo gairė.

Histopatologinis tyrimas

Atliekant chroninio toksiškumo tyrimą:

Reikėtų detaliai ištirti visų, gavusių didelę dozę bei kontrolinių grupių gyvūnų užkonservuotus organus. Jei tiriant didelę dozę gavusią papildomą grupę, nustatomi su tiriamąja medžiaga susiję patologiniai pokyčiai, bet kurios kitos tiriamąja medžiaga veiktos grupės gyvūnų organai, veikti tiriamąja medžiaga, turėtų būti pilnai ištirti histologiniu aspektu, o taip pat tai turi būti padaryta tiriamųjų grupių, atliekant karcinogeniškumo tyrimą bei jo pabaigoje, atveju.

Atliekant karcinogeniškumo testą:

a) reikėtų atlikti visų gyvūnų, kurie nugaišo arba buvo numarinti testo metu, o taipogi visų kontrolinės bei gavusios didelę dozę grupių gyvūnų pilną histopatologinę analizę;

b) reikėtų mikroskopiškai ištirti visose grupėse akivaizdžiai matomus auglius ar sutrikimus, kurie, kaip įtariama, gali būti augliai;

c) jei gavusios didelę dozę ir kontrolinė grupės skiriasi pagal neoplastinių sutrikimų pasireiškimą, tai reikėtų ištirti konkrečius šių grupių organus ar audinius;

d) jei gavusios didelę dozę grupės gyvūnų išgyvenamumas ypač skiriasi nuo kontrolinės grupės, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę;

e) jei egzistuoja įrodymai, kad toksiniai ar kiti efektai galėjo sukelti neoplastinį atsaką grupėje, gavusioje didelę dozę, tai reikėtų detaliai ištirti kitą, mažesnę dozę gavusią grupę.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, gyvūnų, kuriuose buvo pastebėti pakitimai, skaičius, pakitimų tipai bei gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pakitimai, skaičius, išreikštas procentais. Rezultatus reikėtų vertinti atitinkamu statistiniu metodu. Galima naudoti bet kokį visuotinai vartojamą statistinį metodą.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, veislė, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos, pašaras,

([1]) Šie organai, paimti iš 10 kiekvienos lyties ir visų grupių graužikų, turėtų būti pasverti.

— tyrimo sąlygos:

Aparato, kuris naudojamas veikimui medžiaga, aprašymas:

įskaitant konstrukciją, tipą, išmatavimus, oro šaltinį, dalelių ir aerozolių sukūrimo sistemą, vėdinimo metodą, veikimą iškvėptu oru ir gyvūnų laikymo kameroje, kai ji naudojama, metodą. Reikėtų aprašyti matuojamą temperatūrą, drėgmę ir, jei reikia, aerozolių koncentracijų arba dalelių dydžio stabilumą.

Veikimo metu gauti duomenys:

duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant vidurkius ir variacijos dydį (pvz., standartinį nukrypimą) ir pateikiant:

a) oro srauto, pereinančio per įkvėpimo įrangą, greičius;

b) oro temperatūrą ir drėgmę;

c) nominalias koncentracijas (absoliutus įkvėpio įrangoje esančios tiriamosios medžiagos kiekis, padalytas iš oro tūrio);

d) prietaiso, jei jis naudojamas, pobūdį;

e) tikrąsias koncentracijas, esančias tiriamoje kvėpuojamoje zonoje;

f) vidutinius dalelių dydžius (jei įmanoma nurodyti):

— dozių dydžiai (įskaitant prietaisąm jei toks buvo naudotas) ir jų koncentracijos,

— auglių aptikimo duomenys tiriant pagal lytį duotą dozę ir auglių tipą,

— mirties laikas arba tyrimo metu, arba jei gyvūnai išliko iki numarinimo (įskaitant ir papildomos kontrolinės grupės gyvūnus),

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę,

— toksinių ir kitų efektų apibūdinimas,

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių pastebėjimo momentas,

— oftalmologinių stebėjimų rezultatai,

— duomenys apie pašarą bei kūno masę,

— naudoti hematologiniai tyrimai ir jų metu gauti rezultatai,

— naudoti klinikinės biochemijos tyrimai ir jų metu gauti visi (įskaitant bet kurios šlapimo analizės) rezultatai,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— visų histopatologinių tyrimų metu gautų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė ir visų naudotų metodų aprašymai,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2. **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

VIENOS KARTOS DAUGINIMOSI TOKSIŠKUMO TESTAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Tiriamoji medžiaga duodama laipsniškomis dozėmis keleto eksperimentinių grupių gyvūnų patinams bei patelėms. Patinams dozės turėtų būti duodamos augimo metu ir pasibaigus mažiausiai vienai spermatogenezei (praėjus maždaug 56 dienoms – pelių patinams ir 70 dienų – žiurkių patinams) tam, kad būtų galima įvertinti bet kokius neigiamus tiriamosios medžiagos poveikius spermatogenezei.

Tėvinės (P) kartos patelėms turi būti duodama dozė, praėjus mažiausiai dviems rujoms tam, kad būtų galima įvertinti bet kokius neigiamus tiriamosios medžiagos poveikius kiaušinėlių subrendimo atžvilgiu. Tada gyvūnai suporuojami. Tiriamoji medžiaga duodama abejoms lytims poravimosi metu ir vėliau duodama tik patelėms, iš pradžių nėštumo, o vėliau žindymo metu.

Medžiagos davimo įkvepiant metodą reikia modifikuoti.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Mažiausiai penkias dienas prieš testą gyvūnai yra laikomi eksperimentinėje fermoje, kur jie šeriami bei girdomi.

Rekomenduojama, kad tiriamoji medžiaga būtų duodama kartu su pašaru ar geriamuoju vandeniu. Taipogi galima naudoti ir kitus davimo būdus. Visiems gyvūnams tiriamosios medžiagos dozė turėtų būti duodama tuo pačiu metodu atitinkamo eksperimentinio periodo metu. Jei dozavimui naudojamas įrenginys ar kiti priedai, tai jie neturėtų sukelti toksinių efektų.

Dozė turėtų būti duodama septynis kartus per savaitę.

Eksperimentiniai gyvūnai

Rūšių parinkimas

Labiausiai naudojamos gyvūnų rūšys yra pelės arba žiurkės. Reikėtų naudoti sveikus gyvūnus, kurių atžvilgiu anksčiau nebuvo taikytos eksperimentinės procedūros. Tiriamieji gyvūnai turėtų būti apibūdinami pagal rūšį, kamieną, lytį, svorį ir (ar) amžių.

Norint tinkamai įvertinti vaisingumą, reikėtų tirti tiek patinus, tiek ir pateles. Prieš pradedant duoti dozę, visi tiriamieji bei kontroliniai gyvūnai turėtų būti atjunkyti.

Skaičius ir lytis

Kiekvienoje – tiriamojoje ir kontrolinėje – grupėje turėtų būti pakankamas gyvūnų skaičius – apie 20 nėščių patelių, gimdančių arba arti nėštumo pabaigos.

Tai daroma siekiant užtikrinti pakankamą nėštumu ir prieauglio skaičių tam, kad būtų galima įvertinti tiriamosios medžiagos sugebėjimo įtakoti vaisingumą, nėštumą ir patelių elgesį tėvinės kartos P gyvūnuose nuo apvaisinimo iki subrendimo, pirmosios kartos F_1 palikuonių žindymui, augimui bei vystymuisi svarbą.

Tyrimo sąlygos

Pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad limitum*. Artėjant gimdymui, nėščios patelės turėtų būti atskiriamos, perkeliant jas gimdymui ar motinoms skirtus narvelius, kurie turi būti aprūpinti būtiniausiomis medžiagomis gūžtai įrengti.

Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai trys tiriamosios bei viena kontrolinė grupės. Jei tiriamoji medžiaga duodama naudojant prietaisą, kontrolinė grupė kartu su prietaisu turėtų gauti didžiausią tiriamosios medžiagos tūrį. Jei tiriamoji medžiaga pašaro pasisavinimą ar sunaudojimą, tada reikia panaudoti gretutinę maitinamą kontrolinę grupę. Būtų geriausia, kad nekreipiant dėmesio į tiriamosios medžiagos fizikinės/cheminės prigimties ar biologinių veikimo efektų sukeliamus apribojimus, didžiausia dozė sukeltų toksiškumą, bet ne mirtį tėvinės kartos (P) gyvūnų tarpe. Tarpinė tiriamosios medžiagos dozė turėtų sukelti minimalius toksinius efektus ir maža dozė neturėtų sukelti jokių pastebimų žalingų efektų tėvams ar palikuonims. Kai kiekvienam gyvūnui medžiagos dozė duodama per zondą arba su kapsule, tai ji parenkama, atsižvelgus į kiekvieno gyvūno kūno masę ir kalibruojama kiekvieną savaitę priklausomai nuo kūno masės pokyčių. Nėštumo metu medžiagos davimas dozėmis patelėms gali būti pagrindžiamas kūno masės duomenimis 0 arba 6 nėštumo dieną, jei to pageidaujama.

Ribų tyrimas

Jei vartojant mažo toksiškumo medžiagas dozė – 1 000 mg kilogramui – netrukdo dauginimuisi, laikomasi nuostatos, kad tyrimai naudojant kitas dozes nėra būtini. Jei išankstinio tyrimo metu naudojama didelė dozė, sukelianti akivaizdų toksiškumą patelėse, nepažeidžia vaisingumo, tai laikomasi nuostatos, jog tyrimai, naudojant kitas dozes nėra būtini.

Testo atlikimas

Eksperimentų tvarkaraščiai

Kasdieninis dozės davimas tėvinės (P) kartos patinams turėtų prasidėti tada, kai jie sulaukia 5–9 savaičių amžiaus, buvo atjunkyti ir mažiausiai penkias dienas aklimatizavosi. Žiurkių tarpe dozės davimas dar pratęsiamas 10 savaičių, likusių iki suporavimo periodo (pelių tarpe – dar aštuonioms savaitėms). Poravimosi periodo pabaigoje patinai turėtų būti numarinami ir tiriami arba kitu atveju juos galima palikti gyvus ir šerti tyrimo metu tam, kad atsivestų antrąją vadą, po kurios jie turėtų būti numarinti bei tiriami prieš pasibaigiant tyrimui. Tėvinės (P) kartos patelėms dozė turėtų būti pradėta duoti iškart po penkias dienas trukusios aklimatizacijos ir tęstis mažiausiai dvi savaites iki poravimosi periodo pradžios. Šioms patelėms dozė turėtų būti duodama kasdien maždaug tris savaites trunkančio poravimosi periodo bei nėštumo metu iki F_1 kartos palikuonių atjunkymo. Reikėtų apsvarstyti dozės davimo tvarkaraščio pakeitimus, remiantis kita prieinama informacija, tokia kaip tiriamosios medžiagos sukeliamas metabolizmas arba bioakumuliacija.

Poravimosi procedūra

Tiriant toksiškumo įtaką dauginimuisi, poruojama arba santykiu 1:1 (vienas patinas su viena patele) arba santykiu 1:2 (vienas patinas su dviem patelėmis).

Poruojant santykiu 1:1, viena patelė laikoma kartu su vienu patinu tol, kol prasideda nėštumas arba praeina trys savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti tiriamos, ieškant spermos arba makšties kamščio. Nulinė nėštumo diena yra ta, kai randama sperma arba susidaręs makšties kamštis.

Tos poros, kurioms nepasiseka susiporuoti, turėtų būti akivaizdžiai nevaisingomis. Todėl galima imtis tokių papildomų procedūrų kaip poravimo su kitais tikrai veisliniais patinais ar patelėmis, mikroskopiškai analizuojant dauginimosi organus ir tiriant kiaušinėlio ir spermatozoidų susiformavimo ciklą.

Vados dydžiai

Gyvūnams, kuriems vaisingumo tyrimo metu duodama dozė, leidžiama normaliai atsivesti palikuonių ir prižiūrėti juos iki atjunkymo, nestandartizuojant vados dydžio.

Kai atliekamas vados dydžio standartizavimas, siūloma atlikti tokią procedūrą. Praėjus 1–4 dienoms po gimimo, kiekvienos vados dydis gali būti nustatomas, pašalinant perteklinį prieauglį atrankos būdu, stengiantis, kad vienoje vadoje liktų keturi patinėliai ir keturios patelės. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis kiekvienos lyties palikuonis, tai priimtinas dalinis palikuonių skaičiaus reguliavimas (pvz., penki patinėliai ir trys patelės). Tų vadų, kuriose yra mažiau nei aštuoni palikuonys, skaičius nėra reguliuojamas.

Stebėjimai

Testo metu kiekvienas gyvūnas turėtų būti stebimas kasdien. Reikėtų registruoti atitinkamus elgesio pokyčius, komplikuoto arba užsitęsusio nėštumo požymius ir visus toksiškumo požymius, įskaitant mirtingumą. Prieš poravimosi periodą ir jo metu reikėtų kasdien įvertinti pašaro sunaudojimą. Pasibaigus gimdymui ir prasidėjus laktacijai, tuo pat metu reikėtų pasverti vadą per įvertinti pašaro sunaudojimą (ir tuo pat metu įvertinti geriamo vandens sunaudojimą, jei tiriamoji medžiaga duodama su vandeniu). Pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau po savaitės reikėtų pasverti tėvinės (P) kartos patinus ir pateles. Reikėtų pranešti apie šiuos stebėjimus, atliktus ištyrus kiekvieną gyvūną atskirai.

Nėštumo trukmė turėtų būti pradedama skaičiuoti nuo nulinės dienos. Kiekviena vada turi būti pradėta tirti kaip galima greičiau tam, kad būtų galima nustatyti naujagimių lytį, gimimų skaičių ir pagrindines anomalijas.

Nugaišę ir ketvirtą dieną po gimimo numarinti jaunikliai turėtų būti išsaugoti ir ištirti, ieškant galimų sutrikimų. Gimę jaunikliai turėtų būti pasverti ir vados pasvertos gimimo rytą, po ketvirtą bei septintą dieną ir po savaitės bei kol baigsis tyrimas, kai kiekvienas gyvūnas bus pasvertas atskirai. Reikėtų registruoti fizinius ar elgesio sutrikimus veislinėse patelėse bei jų palikuonyse.

Patologija

Skrodimas

Tyrimo metu numarinus ar nugaišus tėvinės kartos (P) gyvūnams, juos reikėtų makroskopiškai ištirti tam, kad nustatyti bet kokias struktūrines anomalijas ar patologinius pakitimus, ypač atkreipiant dėmesį į dauginimosi organus. Nugaišę ar mirštantys gyvūnai turėtų būti ištirti, siekiant nustatyti sutrikimus.

Histopatologinis tyrimas

Mikroskopiniam tyrimui reikėtų išsaugoti tėvinės kartos (P) gyvūnų kiaušides, gimdą, gimdos kaklelį, makštį, sėklides, sėklidės prielipą, spermą gaminančius maišelius, prostatą, koaguliacijos liauką, hipofizę bei tiriamąja medžiaga paveiktus organus. Jei atliekant tyrimus ir naudojant daug skirtingų dozių, šie organai nebuvo tirti, juos reikėtų mikroskopiškai ištirti didelę dozę gavusiuose gyvūnuose, kontrolinės grupės gyvūnuose bei tyrimo metu nugaišusiuose gyvūnuose, jei tai praktiškai įmanoma padaryti.

Tų gyvūnų organai, kuriuose buvo nustatytos anomalijos, turėtų būti ištirti visuose likusiuose tėvinės kartos (P) gyvūnuose. Šiuo atveju, reikėtų mikroskopiškai tirti tuos audinius, kuriuose pastebėti pagrindiniai patologiniai pokyčiai. Kaip buvo pasiūlyta suporavimo procedūrų metu, tų gyvūnų, kurie, kaip įtariama, gali būti nevaisingi, dauginimosi organai turi būti mikroskopiškai tiriami.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti apibendrinami pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, vaisingų bei nėščių patelių skaičius, pokyčių tipai ir gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pokyčiai, skaičius, išreikštas procentais.

Jei įmanoma, išreikšti skaičiais rezultatai turėtų būti apdorojami pasitelkus atitinkamą statistinį metodą. Reikėtų naudoti bet kokį visuotinai naudojamą statistinį metodą.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Jei įmanoma, tai tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— panaudota rūšis/kamienas,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę, įskaitant vaisingumą, nėštumą ir gyvybingumą,

— mirties laikas tyrimo metu arba jei gyvūnai išliko iki tyrimo pabaigos,

— lentelė, kurioje pateikiama kiekvienos vados kūno masė, vidutinis jauniklių svoris vidurkiai ir kiekvieno jauniklio kūno masė tyrimo pabaigoje,

— toksiniai ar kiti efektai, turinys įtakos dauginimuisi, palikuonims bei jų vystymuisi,

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių stebėjimo laikas,

— tėvinės kartos (P) gyvūnų svoris,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— mikroskopinių tyrimų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma tai padaryti,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

DVIEJŲ KARTŲ DAUGINIMOSI TOKSIŠKUMO TESTAS

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Tiriamoji medžiaga duodama laipsniškomis dozėmis keleto eksperimentinių grupių gyvūnų patinams bei patelėms. Tėvinės kartos (P) patinams dozės turėtų būti duodamos augimo metu ir pasibaigus mažiausiai vienai spermatogenezei (praėjus maždaug 56 dienoms – pelių patinams ir 70 dienų – žiurkių patinams) tam, kad būtų galima įvertinti bet kokius neigiamus tiriamosios medžiagos poveikius spermatogenezei.

Tėvinės (P) kartos patelėms turi būti duodama dozė, praėjus mažiausiai dviems rujoms tam, kad būtų galima įvertinti bet kokius neigiamus tiriamosios medžiagos poveikius kiaušinėlių subrendimo atžvilgiu. Tada gyvūnai suporuojami. Tiriamoji medžiaga duodama abiejoms lytims poravimosi metu ir vėliau duodama tik patelėms, iš pradžių nėštumo, o vėliau žindymo metu. Atjunkymo metu tiriamoji medžiaga toliau duodama F_1 palikuonims, jiems augant iki subrendimo, poravimosi metu ir F_2 kartai atsiradus, iki F_2 kartos atjunkymo. Medžiagos davimo įkvepiant metodą reikia modifikuoti.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Prieš pradedant tyrimą sveiki gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Mažiausiai penkias dienas prieš testą tėvinės kartos (P) gyvūnai yra laikomi eksperimentinėje fermoje, kur jie šeriami bei girdomi. Rekomenduojama, kad tiriamoji medžiaga būtų duodama kartu su pašaru ar geriamuoju vandeniu. Taipogi galima naudoti ir kitus davimo būdus. Visiems gyvūnams tiriamosios medžiagos dozė turėtų būti duodama tuo pačiu metodu viso eksperimentinio periodo metu. Jei dozavimui naudojamas įrenginys ar kiti priedai, jie neturėtų sukelti toksinių efektų. Dozė turėtų būti duodama septynis kartus per savaitę.

Eksperimentiniai gyvūnai: rūšių atranka

Labiausiai naudojamos gyvūnų rūšys yra pelės arba žiurkės.

Reikėtų naudoti sveikus tėvinės kartos (P) gyvūnus, kurių atžvilgiu anksčiau nebuvo taikytos eksperimentinės procedūros. Nereikėtų naudoti mažai vaisingų kamienų. Tiriamieji gyvūnai turėtų būti apibūdinami pagal rūšį, kamieną, lytį, svorį ir (ar) amžių.

Tam, kad būtų tinkamai įvertintas vaisingumas, reikėtų tirti tiek patinus, tiek ir pateles. Prieš pradedant duoti dozę, visi tiriamieji bei kontroliniai gyvūnai turėtų būti atjunkyti.

Skaičius ir lytis

Kiekvienoje – tiriamojoje ir kontrolinėje – grupėje turėtų būti pakankamas gyvūnų skaičius – apie 20 nėščių patelių, gimdančių arba arti nėštumo pabaigos. To reikia pakankamam nėštumų ir prieauglio skaičiui užtikrinti, kad būtų galima įvertinti tiriamosios medžiagos sugebėjimą įtakoti vaisingumą, nėštumą ir patelių motinų elgesį bei F_1 palikuonių žindymui, augimui ir vystymuisi nuo apvaisinimo iki subrendimo ir jų palikuonims (F_2) iki atjunkymo svarbą.

Tyrimo sąlygos

Pašaras ir vanduo turėtų būti duodami *ad libitum*. Artėjant gimdymui, nėščios patelės turėtų būti atskiriamos perkeliant jas gimdymui ar motinoms skirtus narvelius, kurie turi būti aprūpinti būtiniausiomis medžiagomis gūžtai įrengti.

Dozė

Turėtų būti naudojamos mažiausiai trys tiriamosios bei viena kontrolinė grupės. Jei tiriamoji medžiaga duodama naudojant prietaisą, kontrolinė grupė kartu su prietaisu turėtų gauti didžiausią tiriamosios medžiagos tūrį. Jei tiriamoji medžiaga pašaro pasisavinimą ar sunaudojimą, tada reikia panaudoti gretutinę maitinamą kontrolinę grupę. Būtų geriausia, kad nekreipiant dėmesio į tiriamosios medžiagos fizikinės/cheminės prigimties ar biologinių veikimo efektų sukeliamus apribojimus, didžiausia dozė sukeltų toksiškumą, bet ne mirtį tėvinės kartos (P) gyvūnų tarpe. Tarpinė tiriamosios medžiagos dozė turėtų sukelti minimalius toksinius efektus ir maža dozė neturėtų sukelti jokių pastebimų žalingų efektų tėvams ar palikuonims. Kai kiekvienam gyvūnui medžiagos dozė duodama per zondą arba su kapsule, tai ji parenkama, atsižvelgus į kiekvieno gyvūno kūno masę ir kalibruojama kiekvieną savaitę priklausomai nuo kūno masės pokyčių. Nėštumo metu medžiagos davimas dozėmis patelėms gali būti pagrindžiamas kūno masės duomenimis 0 arba 6 nėštumo dieną, jei to pageidaujama.

Ribų tyrimas

Jei vartojant mažo toksiškumo medžiagas dozė – 1 000 mg kilogramui – netrukdo dauginimuisi, laikomasi nuostatos, kad tyrimai naudojant kitas dozes nėra būtini. Jei išankstinio tyrimo metu naudojama didelė dozė, sukelianti akivaizdų toksiškumą patelėse, nepažeidžia vaisingumo, laikomasi nuostatos, jog tyrimai naudojant kitas dozes nėra būtini.

Testo atlikimas

Eksperimentų tvarkaraščiai

Kasdieninis dozės davimas tėvinės (P) kartos patinams turėtų prasidėti tada, kai jie sulaukia 5–9 savaičių amžiaus, buvo atjunkyti ir mažiausiai penkias dienas aklimatizavosi. Žiurkėms dozės davimas dar pratęsiamas 10 savaičių, likusių iki suporavimo periodo (pelėms – dar aštuonioms savaitėms). Poravimosi periodo pabaigoje patinai turėtų būti numarinami ir tiriami arba juos galima palikti gyvus ir šerti tyrimo metu tam, kad atsivestų antrąją vadą, po kurios jie turėtų būti numarinti bei tiriami prieš pasibaigiant tyrimui.

Tėvinės (P) kartos patelėms dozė turėtų būti pradėta duoti iškart po penkias dienas trukusios aklimatizacijos ir tęstis mažiausiai dvi savaites iki poravimosi periodo pradžios. Šioms patelėms dozė turėtų būti duodama kasdien maždaug tris savaites trunkančio poravimosi periodo bei nėštumo metu iki F_1 kartos palikuonių atjunkymo. Reikėtų apsvarstyti dozės davimo tvarkaraščio pakeitimus, remiantis kita prieinama informacija, tokia kaip tiriamosios medžiagos sukeliamas metabolizmas arba bioakumuliacija.

F_1 kartos gyvūnams dozė pradedama duoti iškart po atjunkymo ir nebeduodama, kai jie numarinami.

Poravimosi procedūra

Tiriant toksiškumo įtaką dauginimuisi, poruojama arba santykiu 1:1 (vienas patinas su viena patele) arba santykiu 1:2 (vienas patinas su dviem patelėmis).

Poruojant santykiu 1:1, viena patelė laikoma kartu su vienu patinu tol, kol prasideda nėštumas arba praeina trys savaitės. Kiekvieną rytą patelės turėtų būti tiriamos, ieškant spermos arba makšties kamščio. Nulinė nėštumo diena yra ta, kai randama sperma arba susidaręs makšties kamštis. Atsižvelgiant į spermatogenezę, nereikėtų poruoti F_1 kartos palikuonių tol, kol jie nesulaukia vienuolikos savaičių amžiaus (pelės) arba trylikos savaičių (žiurkės). Poruojant F_1 palikuonis, iš kiekvienos vados atsitiktinai parenkamas vienas patinas bei viena patelė tam, kad jie būtų kryžmiškai suporuojami su kitos vados jaunikliais, gaunančiais tą pačią dozę ir kad atsirastų antroji (F_2) palikuonių karta. Pirmos kartos (F_1) patinai ir patelės, kurie nebuvo atrinkti suporavimui, numarinami atjunkymo metu.

Tos poros, kurioms nepasiseka susiporuoti, turėtų būti akivaizdžiai nevaisingomis. Todėl galima imtis tokių papildomų procedūrų kaip poravimo su kitais tikrai veisliniais patinais ar patelėmis, mikroskopiškai analizuojant dauginimosi organus ir tiriant kiaušinėlio ir spermatozoidų susiformavimo ciklą.

Vados dydžiai

Gyvūnams, kuriems vaisingumo tyrimo metu duodama dozė, leidžiama normaliai atsivesti palikuonių ir prižiūrėti juos iki atjunkymo nestandartizuojant vados dydžio.

Kai atliekamas vados dydžio standartizavimas, siūloma atlikti tokią procedūrą. Praėjus 1–4 dienoms po gimimo, kiekvienos vados dydis gali būti reguliuojamas, pašalinant perteklinį prieauglį atrankos būdu, stengiantis, kad vienoje vadoje liktų keturi patinėliai ir keturios patelės. Jei neįmanoma vienoje vadoje turėti po keturis kiekvienos lyties palikuonis, tai priimtinas dalinis palikuonių skaičiaus reguliavimas (pvz., penki patinėliai ir trys patelės). Tų vadų, kuriose yra mažiau nei aštuoni palikuonys, skaičius nėra reguliuojamas. Antros kartos (F_2) vadų dydžio reguliavimas atliekamas tokiu pačiu būdu.

Stebėjimai

Tyrimo metu kiekvienas gyvūnas turėtų būti stebimas kasdien. Reikėtų registruoti atitinkamus elgesio pokyčius, komplikuoto arba užsitęsusio nėštumo požymius ir visus toksiškumo požymius, įskaitant mirtingumą. Prieš poravimosi periodą ir jo metu reikėtų kasdien įvertinti pašaro sunaudojimą. Pageidautina, kad nėštumo metu, kasdien, būtų įvertinamas pašaro suvartojimas. Pasibaigus gimdymui ir prasidėjus laktacijai, tuo pat metu reikėtų pasverti vadą bei įvertinti pašaro sunaudojimą. Pirmąją dozės davimo dieną ir vėliau po savaitės reikėtų pasverti tėvus (P ir F_1 kartos). Reikėtų pranešti apie šiuos stebėjimus, atliktus ištyrus kiekvieną gyvūną atskirai.

Nėštumo trukmė turėtų būti pradedama skaičiuoti nuo nulinės dienos. Kiekviena vada turi būti pradėta tirti kaip galima greičiau tam, kad būtų galima nustatyti naujagimių lytį, gimimų skaičių ir pagrindines anomalijas.

Nugaišę ir 4 dieną po gimimo numarinti jaunikliai turėtų būti išsaugoti ir ištirti ieškant galimų sutrikimų. Gyvi naujagimiai turėtų būti suskaičiuoti ir vados pasvertos gimimo rytą, paskui 4 ir 7 dieną, paskui kas savaitę kol baigsis tyrimas, kai kiekvienas gyvūnas bus pasvertas atskirai. Reikėtų registruoti fizinius ar elgesio sutrikimus veislinėse patelėse bei jų palikuonyse.

Patologija

Skrodimas

Visi tėvinės (P) ir pirmosios palikuonių kartos (F_1) gyvūnai turėtų būti numarinami tada, kai jų nebereikia įvertinant tiriamosios medžiagos poveikį dauginimuisi. Atjunkymo metu reikėtų numarinti F_1 palikuonis, kurie nebuvo atrinkti suporavimui, o taipogi ir F_2 palikuonis.

Tyrimo metu numarinus ar nugaišus visiems tėvams (P ir F_1 kartų gyvūnai), juos reikėtų mikroskopiškai ištirti tam, kad būtų galima nustatyti bet kokias struktūrines anomalijas ar patologinius pakitimus, ypač atkreipiant dėmesį į dauginimosi organus. Nugaišę ar mirštantys jaunikliai turėtų būti ištirti siekiant nustatyti sutrikimus.

Histopatologinis tyrimas

Mikroskopiniam tyrimui reikėtų išsaugoti visų tėvų (P ir F_1 kartų gyvūnų) kiaušides, gimdą, gimdos kaklelį, makštį, sėklides, sėklidės prielipą, spermą gaminančius maišelius, prostatą, koaguliacijos liauką, hipofizę bei tiriamąja medžiaga paveiktus organus. Jei atliekant tyrimus ir naudojant daug skirtingų dozių šie organai nebuvo tirti, juos reikėtų mikroskopiškai ištirti didelę dozę gavusiuose kontroliniuose P ir F_1 gyvūnuose, atrinktuose suporavimui, bei tyrimo metu nugaišusiuose gyvūnuose, jei tai įmanoma padaryti praktiškai. Tie gyvūnų organai, kuriuose buvo nustatytos anomalijos, turėtų būti ištirti kitas dozes gavusiuose gyvūnuose. Reikėtų mikroskopiškai tirti tuos audinius, kuriuose pastebėti pagrindiniai patologiniai pokyčiai. Kaip buvo pasiūlyta suporavimo procedūrų metu, tų gyvūnų, kurie, kaip įtariama, gali būti nevaisingi, dauginimosi organai turi būti tiriami mikroskopiškai.

2. **DUOMENYS**

Rezultatų apdorojimas

Duomenys turėtų būti apibendrinami pasitelkiant lenteles, kuriose nurodomas kiekvienos tiriamosios grupės gyvūnų skaičius tyrimo pradžioje, vaisingų bei nėščių patelių skaičius, pokyčių tipai ir gyvūnų, kuriuose pasireiškė kiekvieno tipo pokyčiai, skaičius, išreikštas procentais.

Jei įmanoma, išreikšti skaičiais rezultatai turėtų būti apdorojami pasitelkus atitinkamą statistinį metodą. Reikėtų panaudoti bet kokį visuotinai naudojamą statistinį metodą.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Jei įmanoma, tyrimo ataskaitoje turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— panaudota rūšis/kamienas,

— duomenys apie toksinį atsaką pagal tirtą lytį ir duotą dozę, įskaitant vaisingumo, nėštumo ir gyvybingumo rodiklius,

— mirties laikas tyrimo metu arba jei gyvūnai išliko iki tyrimo pabaigos,

— lentelė, kurioje pateikiamos kiekvienos vados kūno masės, vidutinis jauniklio svoris ir kiekvieno jauniklio kūno masė tyrimo pabaigoje,

— dauginimąsi, palikuonis bei augimą po gimimo, įtakojantys toksiniai ir kiti efektai,

— kiekvieno nenormalaus požymio ir iš jo išplaukiančių pasekmių stebėjimo laikas,

— tėvinės kartos (P) gyvūnų ir pirmos kartos palikuonių (F_1), atrinktų suporavimui, kūno masės,

— skrodimo metu gauti duomenys,

— mikroskopinių tyrimų duomenų detalus apibūdinimas,

— rezultatų statistinė analizė, jei įmanoma,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų aiškinimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

TOKSIKOKINETIKA

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Tiriamoji medžiaga duodama atitinkamu būdu. Atsižvelgiant į tyrimo tikslą, tam tikrais periodais medžiaga gali būti duodama paviene ar kartotinėmis dozėmis keleto eksperimentinių grupių gyvūnams. Vėliau, priklausomai tuo tyrimo tipo, kūno skysčiuose, audiniuose ir (ar) ekskretuose nustatoma medžiaga ir (ar) metabolitai.

Galima tirti „nežymėtas“ ir „žymėtas“ tiriamosios medžiagos formas. Jei naudojama žymė, tai ji į tiriamąją medžiagą turi būti įvesta taip, kad būtų galima gauti kuo išsamesnės informacijos apie junginio likimą.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Mažiausiai penkias dienas prieš tyrimą sveiki gyvūnų jaunikliai aklimatizuojami laboratorinėmis sąlygomis. Prieš pradedant tyrimą, gyvūnai atsitiktinai atrenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolinę grupes. Ypatingais atvejais galima naudoti labai jaunus gyvūnus, nėščias pateles, bei gyvūnus, iš anksto paveiktus tiriamąja medžiaga.

Tyrimo sąlygos

Eksperimentiniai gyvūnai

Toksikokinetiniai tyrimai gali būti atliekami panaudojant vieną ar daugiau atitinkamų gyvūnų rūšių, ir reikia atsižvelgti į rūšis, kurios yra naudojamos ir kurios pasirinktos naudoti kituose tos pačios tiriamosios medžiagos toksikologiniuose tyrimuose. Jei teste naudojami graužikai, tai jų kūno masės variacija neturėtų viršyti ± 20 % kūno masės vidurkio.

Skaičius ir lytis

Tiriant absorbciją ir ekskreciją, iš pradžių kiekvienoje grupėje, kuriai duodama skirtinga dozė, turėtų būti po keturis gyvūnus. Lyties pasirinkimas nėra būtinas, tačiau ypatingais atvejais reikėtų tirti abi lytis. Jei egzistuoja lyčių skirtumai pagal atsaką, tai reikėtų ištirti po keturis kiekvienos lyties gyvūnus. Tiriant negraužikus, galima naudoti tik keletą gyvūnų.

Kai tiriamas medžiagos pasiskirstymas audiniuose, tyrimo pradžioje reikėtų atsižvelgti į grupės dydį pagal gyvūnų, kurie bus numarinti numatytu laiko momentu, ir laiko momentų, kurių metu bus tiriami gyvūnai, skaičių.

Kai tiriamas metabolizmas, tai grupės dydis priklauso nuo tyrimo poreikių.

Atliekant daugelio dozių ir daugelio laiko momentų tyrimus, reikėtų atsižvelgti į grupės dydį pagal laiko momentus ir numatomus numarinimus, tačiau grupėje turi būti ne mažiau kaip du gyvūnai. Grupė turėtų būti pakankamai didelė, kad būtų galima tinkamai apibūdinti tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų pasisavinimą, stabilizavimąsi bei pašalinimą.

Dozė

Kai duodama pavienė dozė, tai mažiausiai dvi jos koncentracijos turėtų būti naudojamos. Turėtų būti duodama maža, nesukelianti toksinių efektų, dozė ir didelė dozė, kuriai esant, pasireiškia toksiniai efektai arba galėtų pakisti toksikokinetiniai parametrai.

Kai duodama pakartotinė dozė, užtenka tik mažos koncentracijos dozės, tačiau ypatingais atvejais, reikėtų naudoti ir didelės koncentracijos dozę.

Davimo būdas

Toksikokinetinių tyrimų metu reikėtų naudoti tą patį davimo būdą ir, jei reikia, tą patį prietaisą, kuris buvo naudojamas ar buvo pasirinktas naudoti kituose toksikologiniuose tyrimuose. Tiriamoji medžiaga eksperimentiniams gyvūnams paprastai duodama *per os* su zondu ar pašaru, uždedama ant odos arba duodama įkvėpti konkrečiais laiko momentais. Tiriamosios medžiagos intraveninė injekcija gali būti naudinga siekiant nustatyti santykinę medžiagos, duodamos kitais būdais, absorbciją. Be to, atlikus tiriamosios medžiagos intraveninę injekciją, galima gauti naudingos informacijos apie jos pasiskirstymą.

Reikėtų apsvarstyti tą galimybę, kai priemonė gali trukdyti tiriamosios medžiagos davimui. Reikėtų atkreipti dėmesį į absorbcijos skirtumus, kai tiriamosios medžiagos duodamos per zondą ir su pašaru, bei nustatyti tikslią tiriamosios medžiagos, duodamos su pašaru, dozę.

Stebėjimai

Kiekvieną dieną reikėtų stebėti visus gyvūnus bei registruoti toksiškumo požymius ir kitus svarbius klinikinius parametrus, įskaitant efektų pasireiškimo laiką, laipsnį bei trukmę.

Procedūra

Pasvėrus visus tiriamuosius gyvūnus, atitinkamu būdu jiems duodama tiriamoji medžiaga. Jeigu reikia, tiriamieji gyvūnai įtvirtinami prieš duodant medžiagą.

Absorbcija

Duodamos medžiagos absorbcijos greitis bei apimtis gali būti įvertinami įvairiais metodais, panaudojant arba nenaudojant etaloninių grupių ([1]), pvz.:

— nustatant tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį ekskretuose, tokiuose kaip šlapimas, tulžis, išmatos, iškvėptas oras ir tai, kas yra gyvūno lavone be vidurių,

— lyginant tiriamąją ir kontrolinę arba tiriamąją ir etaloninę grupes pagal biologinį atsaką (pvz., atliekant ūmaus toksiškumo tyrimus),

— lyginant tiriamąją ir etaloninę grupes pagal medžiagos ekskreciją per inkstus,

— nustatant tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų zoną, esančią žemiau plazmos ir laiko kreivės ir gautus duomenis lyginant su etaloninės grupės tyrimų duomenimis.

([1]) Šiame metode: etalinonė grupė – tokia grupė, kurioje tiriamosios medžiagos duodamos kitokiu būdu siekiant užtikrinti dozės biologinį tinkamumą.

Pasiskirstymas

Šiuo metu medžiagos pasiskirstymą galima analizuoti dviem būdais:

— tiriant visą kūną autoradiografijos metodu, gaunama naudingos kokybinės informacijos,

— pasibaigus veikimui tiriamąja medžiaga, skirtingu laiko momentu numarinant gyvūnus bei nustatant tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį bei koncentraciją audiniuose ir organuose, gaunama kiekybinės informacijos.

Ekskrecija

Tiriant ekskreciją, surenkamas šlapimas, išmatos, iškvėptas oras ir tam tikrais atvejais, tulžis. Pasibaigus veikimui tiriamąja medžiaga, reikėtų kelissyk nustatyti tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų kiekį šiuose ekskretuose tol, kol ekskrecijos būdu pasišalins apie 95 % duotos medžiagos, arba kai praeis savaitė, pasirenkant vieną iš dviejų.

Ypatingais atvejais reikėtų apsvarstyti tiriamos medžiagos ekskreciją į laktacijos tyrime naudojamų gyvūnų pieną.

Metabolizmas

Biologiniai mėginiai turėtų būti tiriami atitinkamais metodais tam, kad būtų nustatyta metabolizmo apimtis bei pobūdis. Reikėtų nustatyti metabolitų struktūrą bei pasiūlyti galimus metabolitinės apykaitos kelius, jei anksčiau atliktų toksikologinių tyrimų metu liko neišspręstų problemų. Tyrimai *in vitro* padėtų gauti informacijos apie metabolitinės apykaitos kelius.

Detalesnę informaciją apie metabolizmo ir toksiškumo sąsają galima gauti atlikus tokius biocheminius tyrimus, kaip metabolitinių fermentinių sistemų efektų tyrimai, endogeninių nebaltyminės kilmės sulfihidrilinių junginių pasišalinimo analizė bei tiriamosios medžiagos susirišimo su makromolekulėmis tyrimas.

2. DUOMENYS

Atsižvelgiant į atlikto tyrimo pobūdį, duomenys turėtų būti pateikiami apibendrintai, pasitelkiant lenteles ir, jei reikia, pateikiant papildomai ir paveikslus. Kiekvienos tirtos grupės atveju reikėtų nurodyti, jei to reikalaujama, laiko, dozės bei medžiagos pasiskirstymo audiniuose bei organuose matavimų vidurkius ir statistines variacijas. Absorbcijos laipsnis bei ekskrecijos apimtis ir greičiai turėtų būti nustatyti atitinkamais metodais. Kai atliekami metabolizmo tyrimai, reikėtų pateikti identifikuotų metabolitų struktūrą bei galimus metabolitinės apykaitos kelius.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Atsižvelgiant į atlikto tyrimo pobūdį, tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turėtų būti pateikiama tokia informacija:

— panaudota rūšis, kamienas, šaltinis, aplinkos sąlygos,

— žymėtų medžiagų, jei šios buvo naudojamos, apibūdinimas,

— dozių dydžiai ir kaip dažnai jos buvo duodamos,

— davimo būdas ir bet kokie prietaisai, jei buvo naudoti,

— užregistruoti toksiniai ir kiti efektai,

— tiriamosios medžiagos ir (ar) metabolitų biologiniuose mėginiuose, įskaitant iškvėptą orą, nustatymo metodai,

— lyties, dozės, režimo, laiko, audinių bei organų atžvilgiu atliktų matavimų išdėstymas paeiliui,

— ekskrecijos ir absorbcijos apimties laiko ribose pateikimas,
— metabolitų identifikacijos biologiniuose mėginiuose bei apibūdinimo metodai,
— biocheminiai metabolizmo įvertinimo metodai,
— galimi metabolitinės apykaitos keliai,
— rezultatų aptarimas,
— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

MUTAGENIŠKUMO TYRIMAS IR ATRANKA PAGAL KARCINOGENIŠKUMĄ

GENŲ MUTACIJOS – *SACCAROMYCES CEREVISIAE*

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Siekiant įvertinti cheminių agentų (esant arba nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos) sukeliamas genų mutacijas, gali būti naudojami įvairiausi haploidiniai ir diploidiniai *Saccaromyces cerevisiae* kamienai.

Haploidiniuose kamienuose gali būti naudojamos tiesioginės mutacinės sistemos, tokios kaip mutacinis virsmas iš raudonos spalvos mutantų, kurių augimui reikalingas adeninas (*ade*-1, *ade*-2) į dvigubus baltos spalvos mutantus, kurių augimui reikalingas adeninas bei atrankos sistemos, tokios kaip atsparumo kanavalinui ir cikloheksimidui indukcinė sistema.

Plačiausiai naudojamą grįžtamųjų mutacijų tyrimo sistemą sudaro haploidinis kamienas XV 185-14C, kuris turi geno, koduojančio ochros spalvą, beprasmes mutacijas *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1, *trp* 5-48, kurios tampa grįžtamosiomis mutacijomis atlikus bazių pakeitimą mutagenais, sukeliančiais vietos atžvilgiu specifines mutacijas arba geno, koduojančio ochros spalvą, veiklą slopinančias mutacijas. Kamienas XV 185-14C taipogi turi žymę *his* 1-7 – beprasmę mutaciją, kuri gali virsti grįžtamąja mutacija, įvykus mutacijai antroje vietoje, bei žymę *hom* 3-10, kuri tampa grįžtamąja mutacija paveikus ją mutagenais, sukeliančiais skaitymo rėmelio pasislinkimą.

Tarp diploidinių *S. cerevisiae* kamienų plačiausiai naudojamas tėra tik vienas D_7 kamienas, kuris yra homozigotiškas pagal *ilv* 1-92.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Prieš pradedant tyrimą, panaudojant atitinkamą prietaisą, reikėtų paruošti tiriamųjų ir kontrolinių medžiagų tirpalus. Jei tiriami organiniai, vandenyje netirpūs junginiai, tai reikėtų naudoti ne daugiau kaip 2 % organinių tirpiklių, tokių kaip etanolis, acetonas ar dimetilsulfoksidas (DMSO), tirpalus (v/v). Naudojant prietaisą galutinė tirpalo koncentracija neturėtų labai įtakoti ląstelių gyvybingumo bei augimo parametrų.

Metabolitinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamosiomis medžiagomis, esant arba nesant egzogeninės metabolitinės aktyvacijos sistemos.

Graužikų, iš anksto paveiktų fermentus skatinančiais agentais, kepenų postmitochondrinė frakcija, praturtinta kofaktoriumi yra plačiausiai naudojama metabolitinė aktyvacijos sistema. Metabolitinei aktyvacijai galima naudoti ir kitų rūšių bei audinių postmitochondrines frakcijas bei procedūras.

Tyrimo sąlygos

Tiriamieji kamienai

Atliekant genų mutacijų tyrimus labiausiai yra naudojami haploidinis kamienas XV 185-14C ir diploidinis kamienas D_7. Galima naudoti ir kitus kamienus.

Terpė

Nustatant kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko mutacijos, skaičių, naudojama atitinkama kultivavimui skirta terpė.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Reikėtų vienu metu naudoti teigiamas, nepaveiktas tiriamąja medžiaga ir tirpiklio kontroles. Nustatant kiekvieną specifinę galutinę mutaciją, naudojamos atitinkamos teigiamos kontrolės.

Veikimo koncentracija

Reikėtų naudoti mažiausiai penkias, tinkamai atskirtas tiriamosios medžiagos koncentracijas. Toksinių medžiagų atveju, didžiausia tiriamoji koncentracija neturėtų sumažinti kolonijų išgyvenimo mažiau nei 5–10 %. Reikėtų tirti santykinai vandenyje netirpstančių medžiagų tirpumo ribą pagal atitinkamas procedūras. Lengvai vandenyje tirpstančių netoksiškų medžiagų didžiausia koncentracija turėtų būti nustatoma kiekvienu atveju.

Inkubacijos sąlygos

Lėkštelės inkubuojamos 4–7 dienoms 28–30 °C temperatūroje, tamsoje.

Spontaninių mutacijų dažniai

Reikėtų naudoti subkultūras, kuriose spontaninių mutacijų dažniai yra normalūs.

Tikslių kopijų skaičius

Atliekant prototrofų, atsirandančių dėl genų mutacijų bei ląstelių gyvybingumo tyrimą, reikėtų naudoti mažiausiai tris vienos koncentracijos tikslių kolonijų kopijų lėkšteles. Jei eksperimentų metu naudojamos tokios žymės kaip *hom* 3-10, pasižyminčios nedideliu mutacijų dažniu, reikėtų naudoti daugiau tikslių kolonijų kopijų lėkštelių tam, kad gaunami duomenys būtų statistiškai patikimi.

Procedūra

S. cerevisiae kamienai paprastai veikiami tiriamąja medžiaga, ląstelėms esant stacionarinėje arba augimo stadijoje skystoje terpėje. Iš pradžių eksperimentai atliekami su ląstelėmis, esančiomis augimo stadijoje; $1–5×10^7$ ląstelių/ml veikiamos tiriamąja medžiaga 18 valandų 28–37 °C temperatūroje ant kratyklės; jeigu reikia, veikimo metu į terpę įnešamas atitinkamas metabolitinės aktyvacijos sistemos kiekis. Baigiantis veikimui, ląstelės centrifuguojamos, plaunamos ir pasėjamos į atitinkamą kultivavimui skirtą terpę. Po inkubacijos nustatomas plokštelėse kolonijų, kuriose neįvyko arba įvyko genų mutacijos, skaičius.

Jei pirmojo eksperimento gauti rezultatai yra neigiami, tai antrasis eksperimentas atliekamas naudojant ląsteles, esančias stacionarinėje fazėje. Jeigu pirmojo eksperimento metu gauti rezultatai teigiami, jie patvirtinami atlikus atitinkamą nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant kolonijų skaičių, kolonijų, kuriose neįvyko ir kuriose įvyko mutacijos kiekį bei mutacijos dažnį. Visi rezultatai turėtų būti patvirtinti, atlikus nepriklausomą bandymą. Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— panaudotas kamienas,

— tyrimo sąlygos: ląstelių stacionarioji ar augimo fazė, terpės sudėtis, inkubacijos temperatūra ir trukmė, metabolitinės aktyvacijos sistema

— veikimo sąlygos: veikimo laipsnis, veikimo procedūra ir trukmė, veikimo temperatūra, teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— kolonijų skaičius, kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko mutacijos bei mutacijos dažnis, dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma nurodyti, statistinis duomenų įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

MITOZINĖ REKOMBINACIJA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Mitozinė rekombinacija *Saccharomyces cerevisiae* gali būti nustatoma tarp genų (arba konkrečiau, tarp geno ir jo centromeros) ir genų viduje. Ši rekombinacija, vykstanti tarp genų, yra vadinama mitoziniu krosingoveriu, kurio metu susiformuoja atvirkštiniai produktai, tuo tarpu, kai rekombinacijos genų viduje metu susidaro neatvirkštiniai produktai, vadinami genų konversijomis. Apskritai, krosingoveris įvertinamas pagal homozigotinių kolonijų arba sektorių, turinčių recesyvinius genų alelius, produkcijos laipsnį heterozigotiniame kamiene, tuo tarpu genų konversija vertinama pagal prototrofinių revertantų, susiformavusių auksotrofiniame heteroaleliniame kamiene, turinčiame du neveiklius to paties geno alelius, skaičių. Siekiant nustatyti mitozinio geno konversiją, dažniausiai naudojami šie kamienai: D_4 (heteroalelinis pagal *ade* 2 ir *trp* 5), D_7 (heteroalelinis pagal *trp* 5), BZ_{34} (heteroalelinis pagal *arg* 4) ir JD1 (heroalelinis pagal *his* 4 ir *trp* 5). Raudonos ir violetinės spalvos homozigotiniai sektoriai, sukuriantys mitozinį krosingoverį, gali būti vertinami, naudojant D_5 arba D_7 kamienus (taipogi galima įvertinti mitozinę genų konversiją ir grįžtamąją mutaciją, vykstančią *ilv* 1-92), kurie yra heteroaleliški pagal papildančiuosius geno *ade* 2 alelius.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Prieš pradedant tyrimą, panaudojant atitinkamą prietaisą, reikėtų paruošti tiriamųjų ir kontrolinių medžiagų tirpalus. Jei tiriami organiniai, vandenyje netirpūs junginiai, reikėtų naudoti ne daugiau kaip 2 % organinių tirpiklių, tokių kaip etanolis, acetonas ar dimetilsulfoksidas (DMSO), tirpalus (v/v). Naudojant prietaisą, galutinė tirpalo koncentracija neturėtų labai įtakoti ląstelių gyvybingumo bei augimo parametrų.

Metabolitinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamosiomis medžiagomis, esant arba nesant egzogeninės metabolitinės aktyvacijos sistemos. Graužikų, iš anksto paveiktų fermentus skatinančiais agentais, kepenų postmitochondrinė frakcija praturtinta kofaktoriumi yra plačiausiai naudojama metabolitinė aktyvacijos sistema. Metabolitinei aktyvacijai galima naudoti ir kitų rūšių bei audinių postmitochondrines frakcijas bei procedūras.

Tyrimo sąlygos

Tiriamieji kamienai

Dažniausiai naudojami diploidiniai D_4, D_5, D_7 ir JD1. Galima naudoti ir kitus kamienus.

Terpė

Nustatant kolonijų, kuriose neįvyko mitozinė rekombinacija, skaičių ir kolonijų, kuriose įvyko mitozinė rekombinacija, dažnį, naudojama atitinkama terpė skirta kultivavimui.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Reikėtų vienu metu naudoti teigiamas, nepaveiktas tiriamąja medžiaga ir tirpiklio kontroles. Nustatant kiekvieną specifinę galutinę rekombinaciją, naudojamos atitinkamos teigiamos kontrolės.

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti mažiausiai penkias, tinkamai atskirtas tiriamosios medžiagos koncentracijas. Reikėtų apsvarstyti citotoksiškumą ir tirpumą. Mažiausia koncentracija neturi įtakoti ląstelių gyvybingumo. Toksinių medžiagų atveju, didžiausia tiriamoji koncentracija neturėtų sumažinti kolonijų išgyvenimo mažiau nei 5–10 %. Reikėtų tirti santykinai vandenyje netirpstančių medžiagų tirpumo ribą pagal atitinkamas procedūras.

Lengvai vandenyje tirpstančių netoksiškų medžiagų didžiausia koncentracija turėtų būti nustatoma kiekvienu atveju.

Inkubacijos sąlygos

Lėkštelės inkubuojamos 4–7 dienoms 28–30 °C temperatūroje, tamsoje. Analizei naudojamos plokštelės, kuriose, dėka mitozinio krosingoverio, atsiranda raudonos ir violetinės spalvos sektoriai, turėtų būti laikomos šaldytuve (apie 4 °C temperatūroje) papildomai vieną arba dvi dienas prieš nustatant atitinkamai nusidažiusių kolonijų skaičių.

Spontaninės mitozinės rekombinacijos dažniai

Reikėtų naudoti subkultūras, kuriose spontaninės mitozinės rekombinacijos dažniai yra normalūs.

Tikslių kopijų skaičius

Atliekant prototrofų, atsirandančių dėl mitozinio geno konversijos bei ląstelių gyvybingumo tyrimą, reikėtų naudoti mažiausiai tris vienos koncentracijos tikslių kolonijų kopijų lėkšteles. Tiriant recesyvinį homozigotiškumą, atsirandantį dėl mitozinio krosingoverio, reikėtų panaudoti daugiau lėkštelių, kad būtų galima nustatyti tinkamą kolonijų skaičių.

Procedūra

S. cerevisiae kamienai paprastai veikiami tiriamąja medžiaga, ląstelėms esant stacionarinėje arba augimo stadijoje skystoje terpėje. Iš pradžių eksperimentai atliekami su ląstelėmis, esančiomis augimo stadijoje; $1–5×10^7$ ląstelių/ml veikiamos tiriamąja medžiaga 18 valandų 28–37 °C temperatūroje ant kratyklės; jeigu reikia, tai veikimo metu į terpę įnešamas atitinkamas metabolitinės aktyvacijos sistemos kiekis.

Baigiantis veikimui, ląstelės centrifuguojamos, plaunamos ir pasėjamos į atitinkamą kultivavimui skirtą terpę. Po inkubacijos nustatomas plokštelėse kolonijų, kuriose neįvyko arba įvyko mitozinė rekombinacija, skaičius.

Jei pirmojo eksperimento gauti rezultatai yra neigiami, tai antrasis eksperimentas atliekamas, naudojant ląsteles, esančias stacionarinėje fazėje. Jeigu pirmojo eksperimento metu gauti rezultatai teigiami, jie patvirtinami atlikus atitinkamą nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant kolonijų skaičių, kolonijų, kuriose neįvyko ir kuriose įvyko mitozinė rekombinacija, kiekį bei rekombinacijų dažnį.

Visi rezultatai turėtų būti patvirtinti atlikus nepriklausomą bandymą.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— panaudotas kamienas,

— tyrimo sąlygos: ląstelių stacionarioji ar augimo fazė, terpės sudėtis, inkubacijos temperatūra ir trukmė, metabolitinės aktyvacijos sistema,

— veikimo sąlygos: veikimo laipsnis, veikimo procedūra ir trukmė, veikimo temperatūra, teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— kolonijų skaičius, kolonijų, kuriose neįvyko ir įvyko rekombinacijos bei rekombinacijos dažnis, dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma nurodyti, statistinis duomenų įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ GENŲ MUTACIJŲ TYRIMAS *IN VITRO*

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Žinduolių ląstelių kultūrų sistemos gali būti naudojamos cheminių medžiagų sukeltoms mutacijoms aptikti. Plačiai naudojamoms ląstelių linijoms priklauso pelių limfomos ląstelės L5178Y ir kiniškų žiurkėnų ląstelių CHO bei V-79 linijos. Panaudojant labiausiai paplitusias sistemas, šiose ląstelių linijose nustatomos mutacijos, vykstančios timidinkinazės (TK), hipoksantinguanin-fosforibozil-transferazės (HPRT) ([1]) ir Na^+/K^+ jonų siurblio ATPazės lokusuose. TK ir HPRT mutacinių sistemų pagalba nustatomos bazių porų mutacijos, skaitymo rėmelio pasislinkimo mutacijos bei mažos delecijos, tuo tarpu Na^+/K^+ sistemos pagalba tėra nustatomos tik bazių porų mutacijos.

Nesugebančios sintetinti timidinkinazės (TK) dėl tiesioginės mutacijos $TK^+ \longrightarrow TK^-$ ląstelės yra atsparios bromdeoksiuridinui (BrdU), fluordeoksiuridinui (FdU) ir trifluortimidinui (TFT), kadangi, panaudojant „gelbėjančią“ timidinkinazės fermentinę sistemą, šie antimetabolitai nėra įterpiami į ląstelinių nukleotidų sudėtį; nukleotidai, reikalingi ląstelių metabolizmui, susintetinami tiktai *de novo*. Tačiau esant timidinkinazei (TK), BrdU, FdU ir TFT yra įterpiami į ląstelės nukleotidų sudėtį ir dėl šios priežasties slopinamas ląstelės metabolizmas bei citotoksiškumas. Taigi mutantinės ląstelės sugeba proliferuoti, esant terpėje BrdU, FdU ir TFT, tuo tarpu normalios ląstelės, turinčios timidinkinazę, šito padaryti nesugeba. Panašiai, ląstelės, neturinčios HPRT, atrenkamos pagal atsparumą 8-azaguaninui (AG) arba 6-tioguaninui (TG). Ląstelės, kuriose yra pakitusi Na^+/K^+ jonų siurblio ATPazė, atrenkamos pagal atsparumą kvabainui.

Citotoksiškumas nustatomas, įvertinat tiriamosios medžiagos poveikį ląstelių kultūrų sugebėjimui sudaryti kolonijas (klonavimo efektyvumas) ar augimui. Mutacijų dažnis nustatomas pagal žinomą ląstelių, pasėtų į terpę, turinčią atrankai naudojamo agento, naudojamo mutantinėms ląstelėms identifikuoti, skaičių ir į terpę, neturinčią atrankai naudojamo agento, naudojamo ląstelėms, kuriose mutacijos neįvyko, identifikuoti. Pasibaigus atitinkamam inkubacijos periodui, kolonijos suskaičiuojamos. Mutacijos dažnis apskaičiuojamas pagal kolonijų, kuriose mutacijos išnyko tam, kad ląstelės išgyventų, skaičių.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Ląstelės

Galima naudoti įvairiausias ląstelių linijas šiai analizei atlikti. Joms priklauso ląstelių linijų L5178Y, CHO ar V-79 subklonai, ypač jautrūs cheminiams mutagenams, pasižymintys dideliu klonavimo efektyvumu ir spontaninės mutacijos juose vyksta retai. Ląstelės gali būti periodiškai analizuojamos, siekiant įvertinti kariotipo stabilumą bei identifikuojant mikoplazmų sukeliamą infekciją. Galima naudoti ir kitus ląstelių tipus, jei, atliekant cheminėmis medžiagomis sukeltų genų mutacijų analizę, jie pasirodo esą visiškai patikimi.

([1]) Anksčiau HGPRT.

Terpė

Reikėtų naudoti atitinkamą terpę, skirtą kultivavimui, parenkant inkubacijos sąlygas (pvz., temperatūra, indai, skirti kultivavimui, CO_2 koncentracija ir drėgmė). Atsižvelgiant į šios analizės metu naudojamas atrankos sistemas bei ląstelių tipus, pasirenkama terpė bei serumas.

Tiriamoji medžiaga

Prieš veikiant ląsteles tiriamosiomis medžiagomis, šios gali būti paruošiamos terpėje, skirtoje kultivavimui arba, panaudojant atitinkamus prietaisus, ištirpinamos ar suspenduojamos. Galutinė medžiagos, paruoštos naudojant prietaisą, koncentracija kultivavimo sistemoje neturėtų įtakoti ląstelių gyvybingumo ar augimo greičio.

Metabolitinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamosiomis medžiagomis, esant arba nesant egzogeninės metabolitinės aktyvacijos sistemos. Priešingu atveju, jei naudojami ląstelių, pasižyminčių vidiniu metabolitiniu aktyvumu, tipai, tai, prieš pradedant tirti medžiagą, priklausančią konkrečiai cheminių junginių klasei, reikėtų žinoti apie šios medžiagos prigimtį bei aktyvumą.

Tyrimo sąlygos

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Kiekvieno eksperimento metu reikėtų naudoti teigiamas, vartojant tiesiogiai veikiantį junginį ir junginį, kuris metabolitiškai aktyvuojasi bei neigiamas (priemonė) kontroles.

Žemiau pateikiamos medžiagos, kurios gali būti naudojamos kaip teigiamos kontrolės:

— tiesiogiai veikiantys junginiai:

  — etilmetansulfonatas,

  — hikantonas,

— netiesiogiai veikiantys junginiai:

  — 2-acetilamino fluorenas,

  — 7,12-dimetilbenzantracenas,

  — N-nitrozodimetilaminas.

Jeigu reikia, atliekant tyrimą galima naudoti teigiamą kontrolę, priklausančią tai pačiai cheminių junginių klasei, kaip ir tiriamoji medžiaga.

Veikimo koncentracijos

Tiriamoji medžiaga turėtų būti vartojama keliomis koncentracijomis. Esant šioms koncentracijoms, jos turėtų sukelti toksinį efektą, priklausomą nuo koncentracijos; reikėtų vartoti tiek ir didžiausią koncentraciją, kuriai esant ląstelių, kuriose neįvyko mutacijos, skaičius sumažėja bei mažiausią koncentraciją, kuriai esant, ląstelių, kuriose neįvyko mutacijos, skaičius yra lygus tam skaičiui, kai naudojamasi neigiama kontrole.

Naudojant atitinkamas procedūras, reikėtų nustatyti santykinai vandenyje netirpstančių medžiagų tirpumo ribą. Lengvai vandenyje tirpstančių netoksiškų medžiagų didžiausia koncentracija turėtų būti nustatoma kiekvienu atveju.

Procedūra

Kultivuojamų ląstelių skaičius turėtų būti susijęs su spontaninių mutacijų dažniu; paprastai rekomenduojama naudoti tiek gyvų ląstelių, kad spontaninių mutacijų dažnis sumažėtų 10 kartų.

Ląstelės turėtų būti veikiamos atitinkamą laiko tarpą; visais atvejai geriausia veikti jas penkias valandas. Ląstelės, kuriose metabolitinė aktyvacija vyksta silpnai, reikėtų veikti tiriamąja medžiaga, metabolitinės aktyvacijos sistemai esant arba nesant terpėje. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios tiriamosios medžiagos ir kultivuojamos, kad būtų galima nustatyti jų gyvybingumą bei vyktų mutantinio ląstelių fenotipo ekspresija.

Baigiantis ekspresijai, kurio trukmė turėtų būti pakankama, kad naujai atsiradusių mutantų fenotipas optimaliai ekspresuotųsi, ląstelės auginamos terpėje, esant arba nesant atrankai skirtų agentų tam, kad būtų nustatomas mutantų skaičius bei ląstelių gyvybingumas.

Visi duomenys patvirtinami, atlikus nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant, kiek kiekvienoje lėkštelėje buvo tiriamosios medžiagos bei kontrolės, o taipogi sukeltas mutacijas ir ląstelių gyvybingumą. Reikėtų pateikti kolonijų skaičiaus vienoje lėkštelėje vidurkį bei jo standartinį nukrypimą. Mutacijos dažnis turėtų būti išreiškiamas pagal mutantų kiekį gyvų ląstelių skaičiaus atžvilgiu. Ląstelių išgyvenimo ir klonavimo efektyvumas išreiškiami procentais, atsižvelgiant į kontroles.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— panaudota ląstelių linija, ląstelių kultūrų skaičius bei ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,

— tyrimo sąlygos: terpės sudėtis, CO_2 koncentracija, tiriamosios medžiagos koncentracija, panaudotas priemonė, inkubacijos temperatūra, inkubacijos trukmė, ekspresijos trukmė (įskaitant pasėtų ląstelių skaičių, subkultūras bei mitybinių medžiagų įnešimo į terpę tvarkaraščius, jeigu reikia), veikimo trukmė, ląstelių kultūros tankis veikimo metu, panaudotos žinduolių metabolitinės aktyvacijos sistemos tipas, teigiamos ir neigiamos kontrolės, atrankai naudojamas agentas,

— dozės pasirinkimo kriterijai,

— gyvų bei mutantinių ląstelių skaičiaus nustatymo metodas,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2. **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

DNR PAŽAIDOS IR JŲ REPARACIJA – NEPLANUOTA DNR SINTEZĖ – ŽINDUOLIŲ LĄSTELĖSE *IN VITRO*

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Neplanuotos DNR sintezės (NDS) tyrimo metu įvertinama DNR sintezė reparacijos metu, kai iškerpama bei pašalinama cheminiais ar fiziniais agentais pažeista DNR atkarpa. Tyrimas paremtas tričiu žymėto timidino (^{3}H-TdR) įjungimu į žinduolių ląstelių, nesančių ląstelinio ciklo S (sintezės) fazėje, DNR. ^{3}H-TdR įsijungimas į DNR gali būti nustatomas atliekant paveiktų ląstelių DNR autoradiografiją arba registruojant skystosios scintiliacijos įvykius (SSĮ). Išskyrus pirminius žiurkių hepatocitus, naudojamos žinduolių ląstelės kultivuojamos kartu su tyrimo agentu, esant arba nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos. Taipogi NDS galima įvertinti ir sistemose *in vivo*.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Tiriamosios, kontrolinės ar etaloninės medžiagos turėtų būti paruošiamos kultivavimui skirtoje terpėje arba, panaudojant atitinkamus prietaisus, ištirpinamos ar suspenduojamos ir vėliau praskiedžiamos kultivavimui skirta terpe, kad tyrimo metu būtų galima jas naudoti. Galutinė medžiagų koncentracija, pasiekta naudojant prietaisą, neturėtų įtakoti ląstelių gyvybingumo.

Tyrimo metu galima naudoti žiurkių hepatocitų pirmines kultūras, žmogaus limfocitus arba gerai žinomas ląstelių linijas (pvz., žmogaus diploidinius fibroblastus).

Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, esant arba nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos.

Tyrimo sąlygos

Kultūrų skaičius

Atliekant neplanuotos DNR sintezės tyrimą autoradiografijos metodu, reikėtų naudoti mažiausiai dvi ląstelių kultūras, o skystosios scintiliacijos įvykių registravimo metodu – mažiausiai šešias kultūras (arba mažiau, jei moksliškai pagrindžiama), būtinas kiekvienam eksperimento etapui.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Atliekant kiekvieną eksperimentą, reikėtų vienu metu naudoti teigiamas ir neigiamas (neveiktas ir (ar) su prietaisu) kontroles, esant ar nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos.

Atliekant tyrimą ir naudojant žiurkių hepatocitų pirmines kultūras, naudojamos teigiamos kontrolės – 7,12-dimetilbenzantracenas (7,12-DMBA) arba 2-acetilaminofluorenas (2-AAF). Jei naudojamos gerai žinomos ląstelių linijos ir atliekamas neplanuotos DNR sintezės tyrimas tiek autoradiografijos, tiek ir skystosios scintiliacijos įvykių registravimo metodais, nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos, 4-nitrokvinolin-N-oksidas naudojamas kaip teigiama kontrolė, o esant metabolitinės aktyvacijos sistemai – N-dimetilnitrozaminas.

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti daug tiriamosios medžiagos koncentracijų, išdėstytų dideliame intervale, pakankame atsakui nustatyti. Didžiausios koncentracijos tiriamoji medžiaga turėtų sukelti keletą citotoksinių efektų. Turėtų būti ištirti santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio tyrimo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia tiriamoji koncentracija.

Ląstelės

Kultivuojant kultūras reikėtų naudoti atitinkamą terpę ir laikytis atitinkamos CO_2 koncentracijos, temperatūros bei drėgmės. Reikėtų periodiškai tikrinti gerai žinomas ląstelių linijas, siekiant nustatyti mikoplazmų sukeliamą infekciją.

Metabolinė aktyvacija

Kai tiriamos pirminės hepatocitų kultūros, metabolinės aktyvacijos nenaudojamos. Gerai žinomos ląstelių linijos bei limfocitai veikiami tiriamąja medžiaga, esant ar nesant atitinkamai metabolinės aktyvacijos sistemai.

Procedūra

Kultūrų paruošimas

Gerai žinomos ląstelių linijos paruošiamos iš kamieninių kultūrų (veikiant tripsinu arba kratymu), pasėjamos atitinkamu tankumu į terpę kultivavimui skirtuose induose ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje.

Trumpalaikės žiurkių hepatocitų kultūros sukuriamos šviežiai disocijuotus hepatocitus pasėjant į atitinkamą terpę ir leidžiant jiems prisitvirtinti prie augimo paviršiaus.

Žmogaus limfocitų kultūros paruošiamos atitinkamais metodais.

Kultūrų veikimas tiriamąja medžiaga

Pirminiai žiurkių hepatocitai

Šviežiai išskirti žiurkių hepatocitai veikiami tiriamąja medžiaga terpėje, turinčioje ^{3}H-TdR, atitinkamą laiko tarpą. Baigiantis veikimui, terpė atskiriama nuo ląstelių, kurios vėliau sudrėkinamos, fiksuojamos bei išdžiovinamos. Skaidres reikėtų panardinti į autoradiografinę emulsiją (galima naudoti ir fotografinę juostelę), eksponuoti, išryškinti nudažyti ir suskaičiuoti ląsteles.

Gerai žinomos ląstelių linijos ir limfocitai

Autoradiografija: Ląstelių kultūros veikiamos tiriamąja medžiaga atitinkamą laiko tarpą, po to veikiamos ^{3}H-TdR. Laiko trukmė parenkama atsižvelgiant į tiriamosios medžiagos prigimtį, metabolitinių sistemų aktyvumus bei ląstelių tipą. Tam, kad būtų pasiekta pati intensyviausia neplanuota DNR sintezė, ^{3}H-TdR turi būti įnešamas arba vienu metu su tiriamąja medžiaga arba praėjus kelioms minutėms po to, kai buvo įnešta tiriamoji medžiaga. Kuri procedūra bus pasirinkta, nulems tarpusavio sąveika tarp tiriamosios medžiagos ir ^{3}H-TdR. Siekiant atskirti neplanuotą DNR sintezę nuo pusiau konservatyvios DNR sintezės, pastaroji turi būti blokuojama, pvz., panaudojant neturinčią arginino terpę arba terpę, turinčią nedaug serumo, arba pridedant į terpę hidroksišlapalo.

Skystosios scintiliacijos įvykių registacija: Prieš veikiant tiriamąja medžiaga, ląstelių perėjimas į S fazę turėtų būti blokuojamas taip, kaip aprašyta anksčiau; vėliau ląstelės veikiamos tiriamąja medžiaga taip, kaip tai atliekama autoradiografijos metu. Baigiantis inkubacijos periodui, iš ląstelių išskiriama DNR ir nustatomas absoliutus DNR bei į ją įsijungusio ^{3}H-TdR kiekis.

Reikėtų pabrėžti, kad jei, dirbant remiantis aprašytu metodu, naudojami žmogaus limfocitai, tai nestimuliuotų kultūrų atveju pusiau konservatyvios DNR sintezės nėra būtina blokuoti.

Analizė

Autoradiografiniai nustatymai

Įvertinant neplanuotos DNR sintezės intensyvumą ląstelių kultūroje, neskaičiuojami branduoliai, esantys S fazėje. Reikėtų suskaičiuoti mažiausiai 50 ląstelių, esant vienai koncentracijai. Kiekvienoje skaidrėje reikia suskaičiuoti keletą atsitiktinių regionų, plačiai atskirtų vienas nuo kito. Į citoplazmą įsijungusio ^{3}H-TdR kiekis turėtų būti nustatomas, suskaičiuojant tris branduolio apribotus laukelius, esančius jau suskaičiuotų ląstelių citoplazmoje.

Skystosios scintiliacijos įvykių nustatymai

Siekiant įvertinti neplanuotos DNR sintezės intensyvumą pagal užregistruotus skystosios scintiliacijos įvykius, reikėtų naudoti atitinkamą ląstelių kultūrų kiekį,

esant kiekvienai koncentracijai tiriamajame bei kontroliniame mėginiuose.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse.

2.1. Autoradiografiniai nustatymai

Reikėtų atskirai registruoti į citoplazmą įsijungusio ^{3}H-TdR kiekį bei ląstelės branduolyje esančių granulių skaičių.

Apibūdinant į citoplazmą įsijungusio ^{3}H-TdR kiekio bei ląstelės branduolyje esančių granulių skaičiaus pasiskirstymą, galima naudoti vidurkį, medianą ir modą.

2.2. Skystosios scintiliacijos įvykių nustatymai

Nustatant skystosios scintiliacijos įvykius, ^{3}H-TdR įsijungimą išreikšti dpm/μg DNR. Apibūdinant įsijungimo pasiskirstymą, galima panaudoti dpm/μg DNR vidurkį bei standartinį nukrypimą.

Duomenis reikėtų įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— panaudotos ląstelės, tankumas ir persėjimo numeris veikimo metu, ląstelių kultūrų skaičius,

— ląstelių kultūrų kultivavimo metodai, įskaitant terpę, temperatūrą ir CO_2 koncentraciją,

— tiriamoji medžiaga, priemonė, koncentracijos ir tyrimo metu naudojamų koncentracijų pasirinkimo kriterijai,

— metabolitinės aktyvacijos sistemų apibūdinimas,

— veikimo tvarkaraštis,

— teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— panaudotas autoradiografinis metodas,

— ląstelių patekimo į S fazę blokavimo procedūros,

— DNR išskyrimo ir absoliutaus kiekio nustatymo procedūros, atliekant skystosios scintiliacijos įvykių registraciją,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

APSIKEITIMO SESERINĖMIS CHROMATIDĖMIS TYRIMAS *IN VITRO*

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis (ASC) tyrimas trunka trumpai ir jo metu nustatomi grįžtamieji apsikeitimai DNR tarp dviejų seserinių chromatidžių, esančių vienoje dvigubėjančioje chromosomoje. Apsikeitimas seserinėmis chromatidėmis pasikeitimą DNR replikacijos produktais iš pažiūros homologiškuose lokusuose. Pasikeitimo proceso metu neabejotinai įvyksta DNR trūkis ir susiuvimas, tačiau nedaug žinoma apie šio proceso molekulinius mechanizmus. Apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis nustatymui reikia skirtingai pažymėti seserines chromatides ir šitai galima padaryti, įjungiant bromdeoksiuridiną (BrdU) į chromosominę DNR dviejų ląstelinių ciklų metu.

Žinduolių ląstelės veikiamos tiriamąja medžiaga *in vitro*, naudojant arba nenaudojant žinduolių metabolitinę aktyvacijos sistemą, jeigu reikia, ir kultivuojamos dviejų replikacijos ciklų laikotarpiu terpėje, turinčioje bromdeoksiuridino. Paveikus vertės išsisukimo inhibitoriumi (pvz., kolchicinu), ląstelės surenkamos ir paruošiami chromosomų preparatai.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

— Tyrimo metu galima naudoti pirmines kultūras (žmogaus limfocitai) arba gerai žinomas ląstelių linijas (pvz., kiniškojo žiurkėnų kiaušidžių ląsteles). Reikėtų patikrinti, ar ląstelių linijos neužsikrėtusios mikoplazmomis.

— Reikėtų naudoti atitinkamą kultivavimui skirtą terpę bei parinkti inkubacijos sąlygas (pvz., temperatūra, indai, skirti kultivavimui, CO_2 koncentracija bei drėgmė).

— Prieš veikiant ląsteles tiriamosiomis medžiagomis, šios turi būti paruoštos kultivavimui skirtoje terpėje arba, panaudojant atitinkamus prietaisus, ištirpintos ar suspenduotos. Panaudojant tirpiklį kaip kontrolę, reikėtų stebėti, kad, naudojant atitinkamą prietaisą, pasiekta tiriamosios medžiagos galutinė koncentracija kultivavimui skirtoje sistemoje ypatingai neįtakotų ląstelių gyvybingumo ar augimo greičio bei apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis dažnumo.

— Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, esant arba nesant egzogeninei žinduolių metabolitinės aktyvacijos sistemai. Jei naudojami ląstelių, turinčių metabolitinę aktyvacijos sistemą, tipai, tai aktyvumo greitis ir prigimtis turėtų atitikti tiriamąją cheminių junginių klasę.

Tyrimo sąlygos

Kultūrų skaičius

Kiekvieno eksperimento etapo metu reikėtų naudoti mažiausiai dvi kultūras.

Teigiamos ir neigiamos kontrolės

Kiekvieno eksperimento metu reikėtų naudoti teigiamas kontroles, sudarytas tiek iš tiesiogiai veikiančio junginio, tiek junginio, kurį reikia metabolitiškai aktyvuoti; taipogi reikėtų naudoti kontrolę kartu su priemone.

Toliau pateikiamos medžiagos, kurias galima naudoti kaip teigiamas kontroles:

— tiesiogiai veikiąs junginys:

— etilmetansulfonatas,

— netiesiogiai veikiąs junginys:

— ciklofosfamidas.

Jeigu reikia, galima naudoti ir papildomą teigiamą kontrolę, priklausančią tai pačiai cheminių junginių klasei kaip ir tiriamoji medžiaga.

Veikimo koncentracijos

Reikėtų naudoti mažiausiai tris tiriamosios medžiagos koncentracijas, tinkamai atskirtas vieną nuo kitos. Didžiausia koncentracija turėtų sukelti intensyvų toksinį efektą, tačiau nesutrukdyti ląstelių replikacijos ciklui vykti. Panaudojant atitinkamas procedūras turėtų būti tiriami santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio tyrimo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia tiriamoji koncentracija.

Procedūra

Kultūrų paruošimas

Gerai žinomos ląstelių linijos paruošiamos iš kamieninių kultūrų (veikiant tripsinu arba kratymu), pasėjamos atitinkamu tankumu į terpę kultivavimui skirtuose induose ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje. Vienasluoksnių kultūrų atveju ląstelių, esančių kultivavimui skirtame inde, skaičius turėtų būti sureguliuotas taip, kad ląstelių surinkimo metu kultūros susimaišymas siektų ne daugiau 50 %. Ląsteles galima kultivuoti ir suspensijoje. Žmogaus limfocitų kultūros paruošiamos iš heparinizuoto kraujo, panaudojant atitinkamas procedūras ir inkubuojami 37 °C temperatūroje.

Veikimas

Ląstelės, esančios eksponentinėje augimo fazėje, veikiamos tiriamąja medžiaga atitinkamą laiko tarpą; dažniausiai užtenka 1–2 valandų, tačiau konkrečiais atvejais veikimas gali būti pratęsiamas iki dviejų ląstelinių ciklų. Ląstelės, nepasižyminčios pakankamu metabolitiniu aktyvumu, turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, esant ar nesant atitinkamai metabolitinės aktyvacijos sistemai. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios tiriamosios medžiagos ir kultivuojamos du replikacijos periodus terpėje, turinčioje bromdeoksiuridino. Ląsteles galima veikti vienu metu tiriamąja medžiaga ir bromdeoksiuridinu dviejų ląstelinių ciklų trukmės laiko periodu.

Žmogaus limfocitų kultūros veikiamos tuo metu, kai jos yra pusiau sinchroninėje būsenoje.

Ląstelės analizuojamos tada, kai jos pradeda dalintis antrą kartą po veikimo, užtikrinant, kad tiriamąja medžiaga buvo paveiktos ląstelės, esančios pačiuose jautriausiose medžiagos atžvilgiu ląstelinio ciklo fazėse. Visos kultūros, į kurias buvo įneštas bromdeoksiuridinas, laikomos tamsoje arba blankioje dienos šviesos lempų šviesoje iki tol, kol bus surinktos ląstelės tam, kad būtų sumažinta DNR, turinčios bromdeoksiuridino, fotolizė.

Ląstelių surinkimas

Prieš surenkant ląsteles, šios veikiamos verpstės išsisukimo inhibitoriumi (pvz., kolchicinu) 1–2 valandas. Kiekviena kultūra surenkama ir apdorojama atskirai, kad chromosomos būtų paruoštos.

Chromosomų paruošimas ir dažymas

Chromosomos paruošiamos standartiniais citogenetiniais metodais. Skaidrės, skirtos apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis demonstravimui, gali būti dažomos keliais būdais (pvz., panaudojant fluorescencinius dažus ir Giemsa dažymą).

Analizė

Analizuojamų ląstelių skaičius turėtų būti pagrįstas apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis spontaniniu kontroliniu dažniu. Įprastiniu atveju, tiriant apsikeitimą seserinėmis chromatidėmis, mažiausiai 25 gerai matomos metafazės yra analizuojamos. Skaidrės užkoduojamos prieš analizę. Žmogaus limfocitų atveju, analizuojamos tik metafazėje esančios chromosomos, turinčios 46 chromatides. Gerai žinomų ląstelių linijų atveju analizuojamos tik tos metafazinės chromosomos, kurios turi ± 2 modalinį skaičių centromerų. Reikėtų nurodyti ar, tiriant apsikeitimą seserinėmis chromatidėmis, skaičiuojamas žymės centromerinis perjungimas. Rezultatai turi būti patvirtinti, atlikus nepriklausomą eksperimentą.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikti lentelėse. Atskirai nuo paveiktų ir kontrolinių kultūrų turėtų būti atskirai pateiktas apsikeitimų seserinėmis chromosomomis kiekvienoje metafazinėje ir nemetafazinėje chromosomoje skaičius.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— panaudotos ląstelės, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,

— tyrimo sąlygos: terpės sudėtis, CO_2 koncentracija, tiriamosios medžiagos koncentracija, panaudota priemonė, inkubacijos temperatūra, veikimo laikas, panaudotas verpstės išsisukimo inhibitorius, jo koncentracija ir veikimo inhibitoriumi trukmė, panaudotos žinduolių metabolitinės aktyvacijos sistemos tipas, teigiamos ir neigiamos kontrolės,

— ląstelių kultūrų, naudotų kiekviename eksperimento etape, skaičius,

— skaidrių paruošimo metodo aprašymas,

— išanalizuotų metafazių skaičius (kiekvienos kultūros tyrimų duomenys pateikiami atskirai),

— apsikeitimų seserinėmis chromatidėmis vienoje ląstelėje ir vienoje chromosomoje vidurkis (kiekvienos kultūros tyrimų duomenys pateikiami atskirai),

— apsikeitimo seserinėmis chromatidėmis vertinimo kriterijai,

— dozės pasirinkimo kriterijai,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

SU LYTIMI SUSIJĘS RECESYVINIS LETALUS TESTAS *DROSOPHILA MELANOGASTER* TARPE

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Su lytimi susijusio recesyvinio letalaus (LSRL) testo, panaudojant *Drosophila melanogaster*, metu vabzdžio embrioninės linijos ląstelėse nustatomos mutacijos, tiek taškinės, tiek ir nedidelės delecijos. Šis testas yra skirtas tiesioginėms mutacijoms analizuoti ir jo metu galima nustatyti mutacijas, lokalizuotas apie 800 lokusų, sudarančių apie 80 % visų X-chromosomos lokusų. X-chromosoma sudaro maždaug penktadalį haploidinio *Drosophila* genomo.

Drosophila melanogaster X-chromosomoje vykstančios mutacijos pasireiškia fenotipiškai patinuose, turinčiuose mutantinį geną. Kada mutacija yra letali hemizigotinėmis sąlygomis, tai jos egzistavimas reiškia, kad viena iš dviejų patinų grupių neturės palikuonių, kuriuos normaliomis sąlygomis atsiveda heterozigotinės patelės. Atliekant LSRL testą, pasinaudojama šia informacija, specifiškai pažymint bei išdėstant chromosomas.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Padermės

Gali būti naudojami gerai žinomos laukinės padermės patinai ir padermės Muller-5 patelės. Taipogi galima naudoti kitas atitinkamai pažymėtas patelių padermes, turinčias daug invertuotų X-chromosomų.

Tiriamoji medžiaga

Tiriamosios medžiagos turėtų būti tirpinamos vandenyje. Prieš pradedant veikimą, vandenyje netirpstančios medžiagos gali būti ištirpinamos arba suspenduojamos panaudojus atitinkamas priemones (pvz., etanolio ir Tween-60 arba Tween-80 mišinį), o tada praskiedžiamos vandeniu ar druskų tirpalu. Reikėtų vengti naudoti dimetilsulfoksidą (DMSO) kaip tirpinimo priemonę.

Gyvūnų skaičius

Testą reikėtų taip suplanuoti, kad iš anksto būtų numatytas jo jautrumas ir skiriamoji geba. Dažnai pasireiškiančios spontaninės mutacijos, stebimos atitinkamose kontrolėse turės didelės įtakos chromosomų, paveiktų tiriamąja medžiaga ir kurios turi būti analizuojamos, skaičiui.

Davimo būdas

Tiriamoji medžiaga gali būti duodama *per os* būdu, ją injekuojant arba veikiant dujomis ar garais. Tiriamąją medžiagą galima duoti ir su maistu, tačiau šitai daroma naudojant cukraus tirpalą. Jeigu reikia, medžiagos gali būti ištirpinamos 0,7 % NaCl tirpale ir injekuojamos į stemplę ar pilvelį.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Reikėtų naudoti neigiamas (priemonė) ir teigiamas kontroles. Tačiau, jei galima pasinaudoti anksčiau atliktų laboratorinių tyrimų duomenimis, tuo pačiu metu kontrolių naudoti nereikia.

Veikimo dozė

Reikėtų naudoti tris veikimo dozes. Atliekant išankstinį tiriamosios medžiagos įvertinimą, galima naudoti vieną dozę, kuri yra arba didžiausia toleruojamoji koncentracija, arba kuri sukelia kai kuriuos toksiškumo požymius. Veikiant netoksinėmis medžiagomis, reikėtų vatoti maksimalią veikimo koncentraciją.

Procedūra

Laukinio tipo patinai (3–5 dienų amžiaus) veikiami tiriamąja medžiaga ir poruojami individualiai su daugeliu Muller-5 ar kitos atitinkamai pažymėtos (turinčios daug invertuotų X-chromosomų) padermės nekaltų patelių. Kiekvieną 1–3 dieną apvaisintos patelės keičiamos nekaltomis patelėmis tam, kad būtų panaudotas visas embrioninių ląstelių ciklas. Šių patelių palikuonys vertinami pagal letalius efektus subrendusios spermos, vidurinėje ar vėlyvojoje stadijoje esančių spermatidžių, spermatocitų ir spermatogonijų atžvilgiu veikimo metu.

Ankstesniuose kryžminimuose naudotoms heterozigotinėms pirmos palikuonių kartos (F_1) patelėms leidžiama kryžmintis individualiai (viena patelė inde) su jų broliais. Kiekviena F_2 karta įvertinama pagal laukinio tipo patinų neegzistavimą. Jei nustatoma, kad kultūra yra paimta iš F_1 patelės, turinčios letalią X-chromosomos mutaciją (pvz., nebuvo pastebėta patinų su paveikta chromosoma), tai turėtų būti tiriamos tą patį genotipą turinčios šios patelės dukterys tam, kad būtų galima įsitikinti jog letalumas pasikartoja kitoje kartoje.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikti lentelėse, nurodant ištirtų X-chromosomų skaičių, nevaisingų patinų skaičių ir kiekvieno paveikto patino kiekvieno poravimosi periodo metu nustatytų letalių chromosomų skaičių, esant kiekvienai tiriamosios medžiagos koncentracijai, reikėtų registruoti skirtingų dydžių genų klasterių kiekvieno patino genome skaičių. Šie rezultatai turi būti patvirtinti, atlikus atskirą eksperimentą.

Įvertinant su lytimi sukibusių recesyvių letalių genų testų rezultatus, reikėtų panaudoti atitinkamus statistinius metodus. Remiantis atitinkamais statistiniais metodais, reikėtų įvertinti ir apsvarstyti vieno patino recesyvių letalių genų kaupimąsi.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— padermė: panaudotos *Drosophila* padermės ar kamienai, vabzdžių amžius, paveiktų patinų skaičius, streilių patinų skaičius, sukurtų F_2 kartos kultūrų skaičius, F_2 kultūrų, neturinčių palikuonių, skaičius, chromosomų, turinčių letalią mutaciją, nustatytą embrioninės linijos ląstelėse, skaičius,

— grupių, kurios veikiamos, dydžio nustatymo kriterijai,

— tyrimo sąlygos: detalus veikimo ir mėginių paėmimo tvarkaraštis, veikimo koncentracijos, toksiškumo tyrimo duomenys, neigiamos (tirpiklis) ir teigiamos kontrolės, jeigu reikia,

— letalių mutacijų įvertinimo kriterijai,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

— duomenų įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 Įvertinimas ir aiškinimas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

ŽINDUOLIŲ LĄSTELIŲ TRANSFORMACIJOS TESTAI *IN VITRO*

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Siekiant nustatyti cheminių agentų, sukeliančių ląstelių piktybinę transformaciją *in vivo* ir ląstelių fenotipo pokyčius *in vitro*, gali būti naudojamos žinduolių ląstelių kultūrų sistemos. Plačiai naudojamoms ląstelių linijoms priklauso C3H10T½, 3T3, SHE bei Fischer žiurkių ląstelės ir testai grindžiami ląstelių morfologijos pokyčiais, ligos židinio formavimosi bei prisitvirtinimo prie pusiau kieto agaro pokyčių tyrimais. Mažiau naudojamoms sistemoms priklauso tos, kurios naudojamos fiziologiniams bei morfologiniams ląstelių, paveiktų karcinogeninėmis cheminėmis medžiagomis, pokyčiams nustatyti. Nė vieno *in vitro* testų metu nebuvo nustatyta mechanistinio ryšio tarp vėžio ir ląstelių pokyčiu. Naudojant kai kurias tiriamąsias sistemas, galima nustatyti protoonkogenų promotorius. Įvertinant tiriamosios medžiagos įtaką ląstelių kultūrų sugebėjimui suformuoti kolonijas (klonavimo efektyvumas) arba augimo greičiams, galima nustatyti citotoksiškumą. Citotoksiškumo įvertinamas tam, kad būtų nustatyta, jog tiriamoji medžiaga, kuria buvo veikiama, sukelia toksikologinį efektą ir kurios negalima naudoti visuose tyrimuose, apskaičiuojant transformacijos dažnį, kadangi šiuo atveju ląstelių inkubaciją ar persėjimą reikėtų pratęsti.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Ląstelės

Priklausomai nuo naudojamo testo transformacijai įvertinti, galima naudoti įvairiausias ląstelių linijas ar pirmines ląsteles. Tyrėjas privalo užtikrinti, kad tiriamąsias ląsteles paveikus žinomais karcinogenais, šiose pasireiškia atitinkami fenotipiniai pokyčiai ir kad įrodyta bei dokumentiškai patvirtinta, jog tyrėjo laboratorijoje vartojamas testas yra oficialiai pripažįstamas ir patikimas.

Terpė

Atliekant transformacijos tyrimą, reikėtų naudoti atitinkamą terpę bei parinkti atitinkamas eksperimentines sąlygas.

Tiriamoji medžiaga

Prieš veikiant ląsteles, tiriamosios medžiagos gali būti paruošiamos kultivavimui skirtoje terpėje arba ištirpinamos ar suspenduojamos atitinkamomis priemonėmis. Tirpinančiosios priemonės galutinė koncentracija ląstelių kultūrų sistemoje neturėtų įtakoti ląstelių gyvybingumo, augimo greičio ar pasitaikančios transformacijos.

Metabolitinė aktyvacija

Ląstelės turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, tiek esant, tiek ir nesant metabolitinės aktyvacijos sistemos. Kai naudojami ląstelių, pasižyminčių metabolitiniu aktyvumu, tipai, tai aktyvumo prigimtis turėtų atitikti tą klasę, kuriai priklauso naudojamas cheminis junginys.

Tyrimo sąlygos

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Kiekvieno eksperimento metu reikėtų naudoti teigiamas kontroles, sudarytas tiek iš tiesiogiai veikiančio junginio, tiek iš junginio, kurį reikia metabolitiškai aktyvuoti; taipogi reikėtų naudoti ir neigiamas (priemonė) kontroles.

Žemiau pateikiamos medžiagos, kurias galima naudoti kaip teigiamas kontroles:

— tiesiogiai veikią junginiai:

  — etilmetansulfonatas,

  — β-opropiolaktonas,

— junginiai, kuriuos reikia aktyvuoti metabolitiškai:

  — 2-acetilaminofluorenas,

  — 4-dimetilaminobenzenas,

  — 7,12-dimetilbenzantracenas.

Jeigu reikia, galima naudoti ir papildomą teigiamą kontrolę, priklausančią tai pačiai cheminių junginių klasei kaip ir tiriamoji medžiaga.

Veikimo koncentracijos

Tiriamąją medžiagą reikėtų vartoti keliomis koncentracijomis. Šios koncentracijos turėtų sukelti nuo koncentracijos priklausomą toksinį efektą, esant didžiausiai koncentracijai, ląstelių išgyvenimas turėtų sumažėti, tačiau esant mažiausiai koncentracijai, jis turėtų būti toks, kaip ir neigiamai kontrolei esant terpėje. Panaudojant atitinkamas procedūras turėtų būti tiriami santykinai vandenyje netirpūs junginiai, kad būtų nustatyta jų tirpumo riba. Pavienio tyrimo metu turėtų būti nustatyta laisvai vandenyje tirpstančių netoksinių junginių didžiausia tiriamoji koncentracija.

Procedūra

Ląstelės turėtų būti veikiamos atitinkamą laiką, priklausomai nuo naudojamos tyrimo sistemos ir veikimo metu galima pakartotinai veikti su ta pačia medžiagos doze, pakeičiant terpę (jei būtina, į terpę įnešama šviežiai paruošto metabolitinės aktyvacijos mišinio), jei veikimo laikas pailginamas. Ląstelės, nepasižyminčios efektyviai veikiančia metabolitine aktyvacija, turėtų būti veikiamos tiriamąja medžiaga, esant arba nesant atitinkamai metabolitinės aktyvacijos sistemai. Baigiantis veikimui, ląstelės atplaunamos nuo neprisirišusios tiriamosios medžiagos ir, kai nustatoma transformacija bei pasirodo transformuotas fenotipas, kultivuojamos atitinkamomis sąlygomis. Visi rezultatai patvirtinami, atlikus nepriklausomą eksperimentą.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikti lentelėse įvairiausiomis formomis, priklausomai nuo atlikto tyrimo, pvz., nurodant lėkštelių skaičių, teigiamas lėkšteles ar transformuotų ląstelių skaičių. Jeigu reikia, išgyvenimas išreiškiamas procentais kontrolės laipsnio atžvilgiu ir transformacijos dažnis išreiškiamas transformuotų ląstelių, esančių išgyvenusių ląstelių tarpe, skaičiumi.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— panaudotų ląstelių tipas, ląstelių kultūrų skaičius, ląstelių kultūrų kultivavimo metodai,

— tyrimo sąlygos: tiriamosios medžiagos koncentracija, panaudota priemonė, inkubacijos laikas, veikimo trukmė ir dažnis, ląstelių populiacijos tankis veikimo metu, panaudotos egzogeninės metabolitinės aktyvacijos sistemos tipas, teigiamos ir neigiamos kontrolės, stebimo ląstelių fenotipo ypatumai, panaudota atrankos sistema (jei įmanoma), dozės pasirinkimo kriterijai,

— gyvų ir transformuotų ląstelių skaičiaus nustatymo metodas,
— statistinis įvertinimas,
— rezultatų aptarimas,
— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

GRAUŽIKŲ DOMINANTINIS LETALINIS TESTAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Dominantiniai letalūs efektai sukelia embriono arba gemalo mirtį. Veikiant chemine medžiaga, sukeliami dominantiniai letalūs efektai, kurie rodo, kad tiriamoji medžiaga paveikė tiriamosios rūšies gyvūnų embrionų audinius. Apskritai manoma, kad dominantiniai letalūs efektai pasireiškia dėl chromosomų pažeidimų (struktūrinės anomalijos arba chromosomų skaičiaus pokyčiai). Jei patelės paveikiamos medžiaga, ir jų embrionai žūsta, tai šitai taipogi įvyksta dėl toksinių efektų.

Apskritai, gyvūnų patinai paveikiami tiriamąja medžiaga, o vėliau poruojami su nekaltomis patelėmis, nepaveiktomis tiriamąja medžiaga. Poruojant individus paeiliui, tam tikrais laiko tarpais, galima atskirai tirti įvairius embrioninės ląstelės vystymosi etapus. Jei, lyginant su kontrolinės grupės patelių negyvų implantų skaičiumi, šių implantų skaičius padaugėja kiekvienoje paveiktos grupės patelėje, tai rodo, kad implantacija nepavyko. Nesėkmė, atliekant išankstinę implantaciją, gali būti vertinama pagal *corpora lutea* kiekį arba lyginant absoliutų implantų tiriamos bei kontrolinės grupės patelėse skaičių. Absoliutus dominantinis letalus efektas apima nesėkmes, atliekant išankstinę bei vėlesnę implantacijas. Absoliutaus dominantinio letalaus efekto įvertinimas paremtas gyvų implantų, esančių tiriamos bei kontrolinės grupės patelėse, kiekio palyginimu. Konkrečiais laiko intervalais dėl ląstelių (tokių kaip spermatocitų ir (ar) spermatogonijų) žūties gali sumažėti implantų skaičius.

1.5 **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Jei įmanoma, tiriamosios medžiagos turėtų būti ištirpintos ar suspenduotos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos turi būti ištirpintos ar suspenduotos, panaudojus atitinkamas priemones. Naudojama priemonė neturi trukdyti nei tiriamajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams efektams pasireikšti. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus tiriamosios cheminės medžiagos preparatus.

Tyrimo sąlygos

Davimo būdas

Paprastai tiriamasis junginys turėtų būti duodamas vienąkart. Remiantis toksikologine informacija, veikimą galima pakartoti. Paprastai tiriamoji medžiaga duodama *per os*, į trachėją įvedamu vamzdeliu arba injekuojant tiriamąją medžiagą į pilvą. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais.

Eksperimentiniai gyvūnai

Rekomenduojama tirti žiurkes arba peles. Sveiki visiškai lytiškai subrendę gyvūnai atsitiktinai pasirenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolines grupes.

Skaičius ir lytis

Atsižvelgiant į spontaninę tiriamos biologinės rūšies variaciją, reikėtų naudoti pakankamą skaičių patinų, paveiktų tiriamąja medžiaga. Skaičius turėtų būti pasirenkamas, remiantis iš anksto nustatytu tyrimo testo jautrumu bei gaunamų duomenų patikimumu. Pavyzdžiui, atliekant tipinį testą, patinų, priklausančių grupėms, kurių kiekvienai duodama skirtinga dozė, turi būti tiek, kad vieno poravimosi periodo metu būtų apvaisinta 30–50 patelių.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Atliekant kiekvieną eksperimentą, paprastai vienu metu reikėtų naudoti teigimą bei neigiamą (priemonė) kontroles. Kai galima susipažinti su toje pačioje laboratorijoje ką tik atliktų eksperimentų, naudojant teigiamas kontroles, gautais patenkinamais rezultatais, tai šiuos rezultatus galima naudoti vietoj teigiamos kontrolės, naudojamos tuo pačiu metu. Teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti naudojamos atitinkamomis mažomis dozėmis (pvz., MMS, injekuojamos į pilvą, dozė turi siekti 10 mg/kg), kad būtų parodytas tyrimo testo jautrumas.

Veikimo dozė

Reikėtų naudoti tris veikimo dozes. Didelė dozė turėtų sukelti toksiškumo požymius arba sumažinti gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, vaisingumą. Konkrečiais atvejais užtenka ir pavienės didelės dozės.

Ribų tyrimas

Duodant netoksines tiriamąsias medžiagas vienąkart, jų koncentracija turi siekti 5 g/kg, o duodant pakartotinai – 1 g/kg.

Procedūra

Tiriamąsias medžiagas galima duoti įvairiai. Dažniausiai tiriamoji medžiaga duodama vienąkart.

Pasibaigus veikimui, atitinkamais laiko tarpais pavieniai patinai paeiliui poruojami su tiriamąja medžiaga nepaveiktomis nekaltomis patelėmis. Patelės paliekamos su patinais laiko tarpui, lygiam vienai rujai arba tol, kol jie susiporuos, o tai nustatoma pagal spermos patekimą į makštį arba pagal makšties kamščio susidarymą.

Pasibaigus veikimui, atliekama tiek poravimų, kiek yra numatyta veikimo tvarkaraštyje bei turėtų būti užtikrinta, kad pasibaigus veikimui, mėginai paimami atskirais embrioninės ląstelės vystymosi etapais.

Patelės numarinamos praėjus pusei nėštumo periodo ir gimdos turinys tiriamas tam, kad būtų nustatytas gyvų bei žuvusių implantų skaičius. Reikia ištirti kiaušides, kad būtų nustatytas *corpora lutea* skaičius.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, nurodant patinų ir nėščių bei nenėščių patelių skaičių. Reikėtų atskirai registruoti kiekvieno suporavimo rezultatus, nurodant kiekvieno patino ir patelės tapatybę. Taipogi kiekvienos patelės atveju reikėtų registruoti suporavimo savaitę, dozę, gautą iš patinų, gyvų bei negyvų implantų egzistavimo dažnį.

Absoliutus dominantinių letalių efektų skaičius nustatomas, lyginant gyvų implantų skaičių tiriamosios bei kontrolinės grupės patelėse. Tiriamosios grupės patelių gyvų bei negyvų implantų skaičiaus santykis palyginamas su tokiu pačiu kontrolinės grupės implantų skaičiaus santykiu tam, kad nustatyti, ar implantacija nepavyko.

Jei tarp pateikiamų duomenų, nurodomos ankstyvosios bei vėlyvosios mirtys, tai šitai turi būti aiškiai parodyta lentelėse. Jeigu nustatoma, kad išankstinė implantacija nepavyko, tai ji turi būti užregistruota. Ar išankstinė implantacija pavyko ar ne, sprendžiama, lyginant pagal *corpora lutea* ir implantų skaičiaus skirtumus arba pagal vidutinio implantų gimdoje skaičiaus sumažėjimą tiriamojoje grupėje, lyginant su poravimais kontrolinėje grupėje.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— rūšis, kamienas, panaudotų gyvūnų amžius bei svoris, eksperimentinėje bei kontrolinėse grupėse esančių kiekvienos lyties gyvūnų skaičius,

— tiriamoji medžiaga, priemonė, dozės, ir dozių pasirinkimo kriterijai, neigiamos ir teigiamos kontrolės, toksiškumo tyrimų duomenys,

— davimo būdas ir veikimo tvarkaraštis,

— suporavimo tvarkaraščiai,

— metodas, kuriuo nustatoma, kad suporavimas įvyko,

— numarinimo laikas,

— dominantinių letalių mutacijų įvertinimo kriterijai,

— dozės ir atsako sąsaja, jei įmanoma,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

ŽINDUOLIŲ EMBRIONINĖS LĄSTELĖS CITOGENETINIS TYRIMAS *IN VIVO*

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. **Apibrėžimai**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Nėra.

1.4. **Tyrimo metodo principas**

Šio citogenetinio testo *in vivo* metu nustatomos spermatogonijų chromosomų aberacijos. Šio testo metu analizuojamos spermatogonijų chromatidžių mitozės bei chromosomų tipo aberacijos.

Tiriant šiuo metodu, naudojami žinduolių, veiktų tiriamosiomis cheminėmis medžiagomis, duotomis atitinkamais būdais bei numarintų skirtingais laiko tarpais, sėklidžių preparatai. Prieš numarinimą gyvūnai veikiami verpstės išsukimo inhibitoriais, tokiais kaip kolchicinas tam, kad kauptųsi į metafazę panašioje mitozės stadijoje (c-metafazėje) esančios ląstelės. Parošiami chromosomų preparatai, išdžiovinami ore, nudažomi bei mikroskopiškai tiriami.

Pasibaigus spermatogonijų kamieninių ląstelių veikimui tiriamąja medžiaga bei analizuojant diakinezės-I metafazės stadijoje esančius spermatocitus. Siekiant nustatyti multivalentinių chromosomų translokacijas, galima gauti naudingos papildomos informacijos.

1.5 **Kokybės kriterijai**

Nėra.

1.6. **Tyrimo metodo apibūdinimas**

Pasiruošimas tyrimui

Tiriamosios cheminės medžiagos ištirpinamos izotoniniame druskų tirpale. Jei tiriamosios medžiagos netirpsta, jos ištirpinamos bei suspenduojamos panaudojus atitinkamą priemonę. Naudojami šviežiai paruošti tiriamojo junginio tirpalai. Jei tiriamosios medžiagos dozė duodama kartu su tirpinimui naudojama priemone, pastaroji neturi trukdyti tiriamajai cheminei medžiagai veikti arba sukelti toksinius efektus.

Davimo būdas

Paprastai tiriamieji junginiai turėtų būti duodami vienąkart. Remiantis toksikologine informacija, veikimą galima pakartoti. Tačiau veikimas kartojamas tik tada, jei tiriamoji medžiaga nesukėlė toksinių efektų besidiferencijuojančiose spermatogonijose.

Paprastai medžiaga duodama *per os* ar injekuojant ją į pilvo ertmę. Galima naudoti ir kitus davimo būdus.

Eksperimentiniai gyvūnai

Dažniausiai naudojamos pelės ir kiniški žiurkėnai. Galima naudoti ir kitas žinduolių rūšis. Rekomenduojama tirti žiurkes arba peles.

Naudojami lytiškai subrendę patinai, kurie atsitiktinai pasirenkami ir suskirstomi į tiriamąją bei kontrolines grupes.

Gyvūnų skaičius

Eksperimentinėje bei kontrolinėje grupėse turi būti mažiausiai po penkis patinus.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Atliekant kiekvieną eksperimentą, paprastai vienu metu reikėtų naudoti teigimą bei neigiamą (priemonė) kontroles.

Teigiamos kontrolinės medžiagos turėtų būti naudojamos atitinkamomis mažomis dozėmis (pvz., injekuojamo į pilvą mitomicino C dozė turi siekti 0,3 mg/kg), kad būtų parodytas tyrimo testo jautrumas.

Veikimo dozė

Tiriamoji medžiaga duodama viena doze, kuri yra maksimaliai toleruojama arba sukelia kai kuriuos citotoksiškumo reiškinius. Jei ši dozė sukelia visišką ląstelių žūtį, tai tada reikėtų naudoti papildomą mažesnę dozę, sukeliančią citoksiškumą. Kai būtina nustatyti dozės ir atsako sąsają, reikia naudoti mažiausiai tris dozes (pvz., patvirtinti, kad sukeltas teigiamas atsakas pasireiškė silpnai). Vienąkart ir pakartotinai duodant netoksines medžiagas, jas reikia ištirti tam, kad būtų nustatyta pati didžiausia dozė, naudojama praktiškai.

Procedūra

Paprastai gyvūnai veikiami tiriamąja medžiaga vienąkart. Jei duodama didžiausia dozė, pasibaigus veikimui, mėginiai paimami skirtingais intervalais triskart. Pagrindinis mėginių paėmimo intervalas yra 24 valandos. Kadangi tiriamoji medžiaga gali įtakoti ląstelių ciklo kinetinius parametrus, tai 6–48 valandų laikotarpiu nustatomas atitinkamas ankstyvojo bei vėlyvojo mėginių paėmimo intervalas. Duodant medžiagas papildomomis dozėmis, mėginius reikėtų paimti kuo mažesniu intervalu, arba jei jis nėra nustatytas, tai mėginiai paimami praėjus 24 valandoms po veikimo.

Medžiagas galima duoti ir pakartotinai, o gyvūnai turėtų būti numarinami praėjus 24 valandoms po paskutiniojo veikimo. Mėginiai gali būti papildomai paimami 6–48 valandų laikotarpiu.

Sėklidžių paruošimas

Analizuojant spermatogonijų mitozes, gyvūnams į pilvo ertmę injekuojama atitinkama verpstės išsisukimo inhibitoriaus, pvz., kolchicino, dozė. Vėliau gyvūnai numarinami, praėjus atitinkamam laiko tarpui. Pelės numarinamos po 3–5 valandų, kiniški žiurkėnai gali būti numarinti po daugiau nei penkių valandų.

Naudojamasi išdžiovinimu ore. Tiriant skirtingas rūšis, reikia modifikuoti standartinę procedūrą. Gaunamos ląstelių suspensijos veikiamos hipotoniniu tirpalu bei fiksuojamos. Ląstelės išsklaidomos skaidrių paviršiuje bei nudažomos. Skaidrės užkoduojamos ir mikroskopiškai tiriamos.

Analizė

Tiriant struktūrines chromosomų aberacijas, išanalizuojama mažiausiai 100 gerai išsidėsčiusių ir absoliutų centromerų skaičių turinčių mitozinių metafazinių chromosomų. Tam, kad būtų nustatytas galimas citotoksiškumas, iš kiekvieno gyvūno paimamas mėginys, turintis 100 besidalijančių ląstelių bei jame nustatomas I-osios bei I-osios mejozinės metafazės stadijose esančių spermatogonijų mitozinių chromosomų kiekio santykis.

2. **DUOMENYS**

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse, atskirai nurodant visus aberacijų tipus kiekvieno tirtos bei kontrolinės grupės gyvūno ląstelėse. Taipogi pateikiamas absoliutus išanalizuotų ląstelių ir kiekvienos grupės gyvūnų ląstelių, turinčių chromosomines aberacijas, skaičius. Apskaičiuojami visų parametrų vidurkiai bei standartinės paklaidos. Jeigu nustatoma, pateikiamas spermatogonijų mitozinių chromosomų ir I-osios bei II-osios mejozinių metafazinių chromosomų santykis kiekvienos tiriamosios bei kontrolinės grupės atveju.

Rezultatai turėtų būti įvertinti atitinkamais statistiniais metodais.

3. **ATASKAITA**

3.1. **Tyrimo ataskaita**

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— patinų rūšis, kamienas, amžius bei svoris,

— gyvūnų, esančių kiekvienoje tiriamojoje bei kontrolinėje grupėje, skaičius,

— tyrimo sąlygos, detalus veikimo aprašymas, panaudotos dozės, tirpikliai ir verpstės išsukimo inhibitorius,

— kiekvienos grupės kiekvieno gyvūno ištirtų ląstelių skaičius,

— kiekvieno tiriamosios bei kontrolinės grupės gyvūno ląstelių chromosomų aberacijų tipai bei kiekis,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

PELIŲ TAŠKINIS TESTAS

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Šis testas atliekamas naudojant peles, kuriose besivystantys embrionai yra veikiami cheminėmis medžiagomis. Šios medžiagos veikia besivystančių embrionų ląsteles – melanoblastus, kuriuose lokalizuoti genai, kontroliuojantys kailio plaukų spalvą. Besivystantys embrionai yra heterozigotiški pagal daugelį genų, apsprendžiančių kailio spalvą. Įvykus mutacijai melanoblasto tokio geno dominantiniame alelyje arba šį alelį praradus (dėl daugelio genetinių įvykių), iš melanoblasto atsirandančios ląstelės palikuonės įgyja recesyvų fenotipą ir dėl to pelių palikuonių kailyje atsiranda skirtingos spalvos taškai. Nustatomas palikuonių, turinčių tokius taškus, bei juos sukeliančių skaičius bei mutacijų dažnis ir palyginama su palikuonių, kilusių iš embrionų tik tirpikliu, taškų bei juos sukėlusių mutacijų skaičiumi ir dažniu. Pelių taškų tyrimo testo metu nustatomos spėjamos gemalinių ląstelių somatinės mutacijos.

1.5. Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Jei įmanoma, tiriamosios medžiagos turėtų būti ištirpintos ar suspenduotos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos turi būti ištirpintos ar suspenduotos panaudojus atitinkamas priemones. Naudojama priemonė neturi trukdyti nei tiriamajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams efektams pasireikšti. Reikėtų naudoti šviežiai paruoštus tiriamosios cheminės medžiagos preparatus.

Eksperimentiniai gyvūnai

T kamieno (*nonagouti*, a/a; šinšilės, violetinių akių, $c^{ch}p/c^{ch}p$; rudos, b/b; atmieštos spalvos, trumpų ausų, d se/d se; margas taškuotumas, s/s) pelės yra poruojamos arba su HT kamieno (blyškios, *nonagouti*, trumpų kojų, pa a bp/pa a bp; labai tankaus kailio ln fz/ln fz; perlų spalvos pe/pe) arba su C57 BL (*nonagouti*, a/a) pelėmis. Taipogi galima poruoti kamienų NMRI (*nonagouti*, a/a; albinosai, c/c) ir DBA (*nonagouti*, a/a; rudos, b/b; atmieštos spalvos d/d) peles tam, kad jų palikuonys turėtų *nonagouti* tipo mutaciją.

Skaičius ir lytis

Pakankamai nėščios patelės veikiamos kiekviena tiriamosios medžiagos doze tam, kad kiekvienu atveju jos atsivestų pakankamai palikuonių. Paimant atitinkamo dydžio mėginį, atsižvelgiama į pelių, paveiktų tiriamąja medžiaga, kailio taškuotumą bei kontrolinių duomenų gausą. Neigiamas rezultatas laikomas priimtinu, jei buvo įvertinta mažiausiai 300 palikuonių, kuriuos atsivedė patelės, paveiktos tiriamąja medžiaga.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Turi būti gaunami kontroliniai duomenys, vienu metu ištyrus peles, paveiktas tik tirpinimui naudojama priemone (neigiamomis kontrolėmis). Anksčiau toje pačioje laboratorijoje atliktų tyrimų kontroliniai duomenys irgi gali būti surenkami, kad būtų užtikrintas duomenų vientisumas ir padidėtų testo jautrumas. Jei buvo nustatyta, kad tiriamoji cheminė medžiaga nėra mutageniška, toje pačioje laboratorijoje turi būti atliekamas testas su mutageniška tiriamąja medžiaga ir gaunami teigiamų kontrolių tyrimo duomenys.

Davimo būdas

Paprastai tiriamoji medžiaga duodama nėščioms patelėms per vamzdelį, įvestą į trachėją arba injekuojant į pilvą.

Veikimo dozė

Naudojamos tris veikimo dozes, iš kurių viena sukelia toksiškumo požymius arba sumažina vados dydį. Naudojant netoksines chemines medžiagas, reikėtų duoti pačią didžiausią dozę, kuri praktiškai įmanoma.

Procedūra

Pavienis veikimas tiriamąja medžiaga įprastai atliekamas 8, 9 ar 10 nėštumo dieną, skaičiuojant nuo 1 dienos, kuri laikoma ta diena, kai makšties kamštis buvo pastebėtas pirmąsyk. Šios dienos atitinka 7,25, 8,25 ir 9,25 dienas, praėjusias nuo apvaisinimo. Tomis dienomis galima sėkmingai atlikti veikimus tiriamosiomis medžiagomis.

Analizė

Palikuonys yra užkoduojami ir, praėjus 3–4 savaitėms po gimimo, įvertinami pagal taškus. Skiriamos trys taškų klasės:

a) baltos spalvos 5 mm diametro taškai, išsidėstę pilvo dalyje ir tikriausiai atsiradę dėl ląstelių žūties (BVPT);

b) geltonos spalvos, panašūs į *agouti* taškai, stebimi krūties, lytinių liaukų, viršugalvio ašinėje ir kirkšninėje srityse, kurie, kaip manoma, atsirado dėl sutrikusios ląstelių diferenciacijos (SDT);

c) pigmentuoti ir baltos spalvos taškai, išsimėtę kailyje ir, manoma, kad tai susiję su somatinėmis mutacijomis (SMT).

Visos trys taškų klasės, išskyrus paskutiniąją, įvertinamos pagal genetinę reikšmę. Problemos, atsirandančios dėl taškų, atsirandančių, sutrikus ląstelių diferenciacijai, ar somatinių mutacijų, atskyrimo išsprendžiamos, atlikus kailio mėginių fluorescencinę analizę.

Reikėtų registruoti akivaizdžias pagrindines morfologines anomalijas, pasireiškiančias palikuonių tarpe.

2. DUOMENYS

Pateikiant duomenis, reikėtų nurodyti ištirtus palikuonius bei pateikti gyvūnų, turinčių vieną ar daugiau spėjamų somatinių mutacijų, skaičių. Paveiktų ir neigiamų kontrolinių grupių tyrimų duomenys turėtų būti palyginti atitinkamais metodais. Duomenys pateikiami, atsižvelgiant į kiekvieną vadą.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— poravimui panaudoti kamienai,

— tiriamoje bei kontrolinėse grupėse esančių nėščių patelių skaičius,

— vidutinis vados dydis tiriamojoje bei kontrolinėje grupėse gimimo bei atjunkymo metu,

— tiriamosios cheminės medžiagos dozės,

— metodas, kuriuo nustatoma, kad suporavimas įvyko,

— panaudotas tirpiklis, – nėštumo diena, kurią buvo pradėtas veikimas tiriamąja medžiaga,
— veikimo būdas,
— absoliutus įvertintų palikuonių ir tiriamojoje bei kontrolinėje grupėse esančių BVPT, SMT ir SPT skaičius,
— pagrindinės morfologinės anomalijos,
— jei įmanoma, dozės ir atsako sąsaja SPT tyrimo atveju,
— statistinis įvertinimas,
— rezultatų aptarimas,
— rezultatų interpretavimas.

3.2 **Įvertinimas ir aiškinimas**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. **NUORODOS**

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

PELIŲ PAVELDĖTA TRANSLOKACIJA

1. METODAS

1.1. Įvadas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.2. Apibrėžimai

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

1.3. Etaloninės medžiagos

Nėra.

1.4. Tyrimo metodo principas

Tiriant paveldimą translokaciją pelėse, nustatomi žinduolių embrioninių ląstelių chromosomų struktūriniai bei skaičiaus pokyčiai, kurie išnyksta pirmos kartos palikuonyse. Nustatomi tokie chromosomų pokyčiai: atvirkštinės translokacijos ir X-chromosomos praradimas tuo atveju, jei tiriamos palikuonių patelės. Gyvūnų, turinčių translokacijas bei XO-patelių vaisingumas yra sumažėjęs ir pagal tai atrenkami F_1 palikuonys, kurie bus naudojami citogenetinei analizei. Visiškas sterilumas stebimas konkrečių translokacijų atveju (X-autosoma ir c-t tipas). Atliekant citogenetinę analizę, translokacijos nustatomos arba F_1 patinuose arba F_1 patelių vyriškos lyties palikuonių ląstelėse, besidalijančiose mejozės būdu, ląstelėms esant diakinezės-I metafazės stadijoje. Atliekant citogenetinę analizę, XO-patelės nustatomos tik pagal kaulų čiulpų ląsteles, besidalijančias mitozės būdu ir turinčias tik 39 chromosomas.

1.5 Kokybės kriterijai

Nėra.

1.6. Tyrimo metodo apibūdinimas

Pasiruošimas tyrimui

Tiriamosios medžiagos ištirpinamos izotoniniame druskų tirpale. Vandenyje netirpios cheminės medžiagos ištirpinamos ar suspenduojamos, panaudojus atitinkamas priemones. Naudojami šviežiai paruošti tiriamosios cheminės medžiagos tirpalai. Jei priemonė duodama kartu su tiriamosios medžiagos doze, tai ji neturi trukdyti nei tiriamajai cheminei medžiagai veikti, nei toksiniams efektams pasireikšti.

Davimo būdas

Paprastai tiriamoji medžiaga duodama *per os*, į trachėją įvedamu vamzdeliu arba injekuojant tiriamąją medžiagą į pilvą. Medžiagą galima duoti ir kitais būdais.

Eksperimentiniai gyvūnai

Tam, kad palengvėtų kryžminimas bei citologinis patvirtinimas, šie eksperimentai atliekami su pelėmis. Specifinis pelių kamienas nėra būtinas. Tačiau vienam kamienui priklausančių gyvūnų vadoje vidutiniškai bei pastoviai turėtų būti daugiau nei aštuoni palikuonys. Naudojami sveiki lytiškai subrendę gyvūnai.

Gyvūnų skaičius

Gyvūnų, būtinų tyrimui atlikti, skaičius priklauso nuo spontaninės translokacijos dažnio bei mažiausio translokacijos sukėlimo greičio, kuris būtinas tam, kad būtų gaunamas teigiamas rezultatas.

Testas paprastai atliekamas analizuojant patinų F_1 palikuonis. Tiriant gyvūnų, kuriems buvo duota konkreti tiriamosios medžiagos dozė, grupę, reikėtų išanalizuoti mažiausiai 500 patinų F_1 palikuonis. Jei tiriami patelių F_1 palikuonys, tyrimui atlikti reikia po 300 patinų bei patelių.

Teigiamų ir neigiamų kontrolių naudojimas

Reikėtų remtis atitinkamais kontroliniais duomenimis, gautais atliekant tyrimą ir vienu metu naudojant kontroles bei anksčiau atliktų tyrimų metu naudotas kontroles. Kai galima susipažinti su toje pačioje laboratorijoje ką tik atliktų eksperimentų, naudojant teigiamas kontroles, gautais patenkinamais rezultatais, šiuos rezultatus galima naudoti vietoj teigiamos kontrolės, naudojamos tuo pačiu metu.

Veikimo dozė

Tyrimo metu paprastai naudojama pavienė ir pati didžiausia dozė, sukelianti silpniausiai pasireiškiančius toksinius efektus, tačiau neįtakojanti elgsenos dauginimosi metu ar išgyvenimo. Siekiant nustatyti dozės ir atsako sąsają, reikėtų panaudoti dvi nedideles papildomas dozes. Netoksinių cheminių medžiagų atveju reikėtų naudoti pačią didžiausią dozę.

Procedūra

Veikimas ir poravimas

Veikti tiriamąja medžiaga galima dvejopai. Dažniausiai tiriamoji medžiaga duodama vienąkart. Taipogi medžiagą galima duoti 35 dienų laikotarpiu, septynias dienas per savaitę. Pasibaigus veikimui, atliekami poravimai pagal tvarkaraštį ir reikėtų užtikrinti, kad buvo paimti visų brendimo stadijų paveiktų embrioninių ląstelių mėginiai. Baigiantis poravimui, patinai ir patelės atskiriami ir patalpinami į atskirus narvelius. Kai patelės atsiveda jauniklius, registruojamas palikuonių gimimo data, vados dydis bei palikuonių lytis. Visi vyriškos lyties palikuonys atjunkomi, o visi moteriškos lyties palikuonys pašalinami nepaisant to, kad jie naudojami eksperimento metu.

Translokacijos heterozigotiškumo tyrimas

Galima naudotis vienu iš dviejų galimų metodų:

— F_1 palikuonių vaisingumo tyrimas ir gyvūnų, kurie gali turėti translokacijas, identifikavimas citogenetinės analizės būdu,

— visų F_1 vyriškos lyties palikuonių citogenetinė analizė, neatrenkant jų iš anksto pagal vaisingumą.

a) Vaisingumo tyrimas

Sumažėjęs F_1 gyvūno vaisingumas gali būti nustatomas, stebint vados gausą ir (ar) analizuojant patelių, kurios buvo naudojamos poravimui, gimdos turinį.

Atsižvelgiant į naudojamą pelių kamieną, reikia pasirinkti kriterijus, pagal kuriuos bus sprendžiama apie normalų ir sumažėjusį vaisingumą.

Vados dydžio stebėjimas: Tiriami F_1 patinai yra laikomi atskirai arba nuo tame pačiame eksperimente naudojamų arba nuo visos pelių kolonijos patelių. Narvai stebimi kasdien, pradedant nuo 18 dienos, praėjusios po suporavimo. Patelėms atsivedus F_2 palikuonis, užregistruojamas vados dydis bei palikuonių, kurie po to pašalinami, lytis. Jei tiriami moteriškos lyties F_1 palikuonys, tai mažos F_2 vados bus tiriamos vėliau. Translokacijas turinčios patelės identifikuojamos, atliekant translokacijos citogenetinę analizę, naudojant bet kurį jų vyriškos lyties palikuonį. XO patelės identifikuojamos pagal lyčių santykio jų palikuonių tarpe pokyčius – 1:1 (patinai/patelės) $\rightarrow$ 1:2 (patinai/patelės). Vėliau normalūs F_1 gyvūnai toliau nebetiriami, jei F_2 vados dydis pasiekia arba peržengia iš anksto nustatytą normalią ribą, priešingu atveju stebimos antroji bei trečioji F_2 vados.

F_1 gyvūnų, kurių negalima laikyti normaliais, baigus net trijų F_2 vadų stebėjimus, atveju reikia arba tirti patelių, kurios buvo poruojamos su patinais, gimdos turinį arba reikia iškart pradėti gyvūnų citogenetinę analizę.

Gimdos turinio analizė: Translokacijas turinčių gyvūnų vados dydis sumažėja dėl embrionų žūties, todėl daug žuvusių implantų parodo, kad tiriamieji gyvūnai turi translokacijas. Kiekvienas F_1 patinas, kuris bus tiriamas, suporuojamas su 2–3 patelėmis. Apvaisinimas nustatomas kiekvienos dienos rytą ieškant makšties kamščio susidarymo. Praėjus 14–16 dienų po apvaisinimo patelės numarinamos ir užregistruojami gyvi bei žuvę implantai, esantys gimdoje.

b) Citogenetinė analizė

Sėklidės paruošiamos, išdžiovinant jas ore. Gyvūnai, turintys translokacijas, identifikuojami pagal pirminių spermatocitų, esančių mejozės diakinezės-I metafazės stadijoje, multivalentinių chromosomų konfigūracijas. Nustačius šiuos multivalentinius darinius mažiausiai dviejose ląstelėse, galima teigti, kad tiriamasis gyvūnas turi translokacijas.

Jei nebuvo vykdoma atranka pagal kryžminimus, tai visi F_1 patinai tiriami citogenetiniu aspektu. Reikia mikroskopiškai ištirti mažiausiai 25 vieno patino ląsteles, esančias diakinezės-I metafazės stadijoje. Jei įtariama, kad F_1 patinuose, turinčiuose menkas sėklides bei F_1 XO patelėse mejozė nutraukiama, prieš prasidedant diakinezei, reikia ištirti šių patinų spermatogonijų arba kaulų čiulpų ląstelių bei patelių kaulų čiulpų ląstelių mitozines metafazines chromosomas. Mažiausiai dešimtyje ištirtų ląstelių nustatytos neįprastai ilgos ar trumpos chromosomos parodo, kad vienas ar kitas patinas yra sterilus pagal chromosomų translokacijas (c-t tipas). Kai kurios X-autosomų translokacijos, apsprendžiančios patinų sterilumą, gali būti nustatomos tiktai atliekant mitozinių chromosomų juostų elektroforezinę analizę. Jei tirtos patelės atveju bent 10 mitozės atvejų užregistruojamos 39 chromosomos, tokia patelė laikoma XO.

2. DUOMENYS

Duomenys turėtų būti pateikiami lentelėse.

Atliekant kiekvieną poravimą, registruojamas vidutinis vados dydis bei lyčių santykis, pradedant nuo tėvų poravimo ir baigiant palikuonių gimimu bei jų atjunkymu.

Įvertinant F_1 gyvūnų vaisingumą, pateikiamas vidutinis vados dydis normalių poravimų atveju bei atskirų F_1 gyvūnų, turinčių translokacijas, vadų dydžiai. Tiriant gimdos turinį, pateikiamas vidutinis gyvų bei žuvusių implantų skaičius normalių poravimų atveju ir atskirų F_1 gyvūnų, turinčių translokacijas, gyvų bei žuvusių transplantų skaičius kiekvieno poravimo atveju.

Atliekant ląstelių, esančių diakinezės-I metafazės stadijoje, citogenetinę analizę, nurodomas multivalentinių chromosomų konfigūracijų tipų kiekis bei absoliutus ląstelių, naudotų, tiriant kiekvieną translokacijas turintį gyvūną, absoliutų skaičių.

Tiriant sterilius F_1 gyvūnus, pateikiamas absoliutus poravimų skaičius bei poravimo periodo trukmė. Nurodomi sėklidžių svoriai bei citogenetinės analizės duomenys.

Tiriant XO pateles, nurodomas vidutinis vados dydis, lyčių santykis F_2 palikuonių tarpe bei citogenetinės analizės duomenys.

Jei numanomi F_1 gyvūnai, turintys translokacijas, tiriami pagal vaisingumą, taip atrenkant juos iš anksto, pateikiamos lentelės, kuriose nurodoma, kiek iš tų F_1 gyvūnų yra heterozigotų pagal translokacijas.

Pateikiami eksperimentų, kurių metu naudojamos teigiamos bei neigiamos kontrolės, duomenys.

3. ATASKAITA

3.1. Tyrimo ataskaita

Tyrimo ataskaitoje, jei įmanoma, turi būti pateikiama tokia informacija:

— pelių kamienas, gyvūnų amžius, gyvūnų, paveiktų tiriamąja medžiaga, kūno masė,

— kiekvienos lyties tėvinių gyvūnų skaičius tiriamojoje bei kontrolinėje grupėse,

— tyrimo sąlygos, detalus veikimo aprašymas, dozės, tirpikliai, suporavimo tvarkaraštis,

— kiekvienos patelės atsivestų palikuonių skaičius bei lytis, palikuonių, užaugintų translokacijos tyrimams, skaičius bei lytis,

— translokacijos tyrimo laikas bei kriterijai,

— gyvūnų, turinčių translokacijas, detalus apibūdinimas bei jų skaičius, įskaitant kryžminimo duomenis bei gimdos turinio analizės rezultatus, jei reikia,

— citogenetinės procedūros ir mikroskopinės analizės apibūdinimas, pageidautina, pateikiant schemas,

— statistinis įvertinimas,

— rezultatų aptarimas,

— rezultatų interpretavimas.

3.2 Įvertinimas ir aiškinimas

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

4. NUORODOS

Žr. Bendrojo įvado B dalį.

C DALIS. EKOTOKSIŠKUMO NUSTATYMO METODAI

BENDRASIS ĮVADAS. C DALIS

Toliau aprašyti metodai, skirti nustatyti kai kurias Direktyvos 79/831/EEB VIII priede pateiktas ekotoksikologines savybes. Duomenų teikėjai turi žinoti, kad toliau išvardyti VIII priedo 1 pakopoje numatytų savybių nustatymo metodai į tekstą neįtraukti:

— ilgai trunkantis toksiškumo tyrimas su *Daphnia magna,*

— bandymai su aukštesniaisiais augalais,

— ilgai trunkantis toksiškumo tyrimas su žuvimis,

— biologinės rūšies kaupimosi bandymas.

Kai atitinkami bandymo metodai šioms savybėms nustatyti bus galutinai patvirtinti, jie bus išleisti tolesnio pritaikymo technikos pažangai dokumentų pavidalu. Iki to laiko duomenų teikėjai turi taikyti atitinkamus, tarptautiniu mastu pripažintus metodus, kuriuos turi identifikuoti atsakingoji institucija.

DUMBLIŲ INHIBAVIMO BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Šio bandymo tikslas – nustatyti, kaip medžiagos veikia vienaląsčių žalių dumblių rūšių augimą. Per palyginti trumpai trunkančius bandymus galima įvertinti poveikius kelioms kartoms. Šis metodas gali būti pritaikytas taikyti kelioms vienaląsčių dumblių rūšims, tokiu atveju su bandymo ataskaita turi būti pateiktas metodo aprašymas.

Šį metodą lengviausia taikyti vandenyje tirpioms medžiagoms, kurios bandymo sąlygomis greičiausiai lieka vandenyje.

Gali būti neįmanoma kiekybiškai nustatyti EC_{50} toms medžiagoms, kurių tirpumas bandymo terpėje yra ribotas (žr. toliau „Apibrėžimai“).

Metodą galima taikyti medžiagoms, kurios tiesiogiai netrukdo matuoti dumblių augimą.

Darant šį bandymą gali būti naudinga šį informacija:

— tirpumas vandenyje,

— garų slėgis,

— struktūrinė formulė,

— medžiagos grynumas,

— cheminis stabilumas vandenyje ir apšvietus,

— analizės metodai medžiagos kiekiui vandenyje nustatyti,

— pK_a vertė,

— pasiskirstymo tarp *n*-oktanolio ir vandens koeficientas,

— lengvo biologinio skaidymo bandymo rezultatai.

1.2. **Apibrėžimai ir vienetai**

Ląstelių koncentracija: ląstelių skaičius viename mililitre;

Augimas: ląstelių koncentracijos padidėjimas per bandymo laiką;

Augimo greitis: ląstelių koncentracijos didėjimas per laiko vienetą;

EC_{50} taikant šį metodą – tai bandomosios medžiagos koncentracija, kuriai esant augimas arba augimo greitis palyginti su kontroliniais bandymais sumažėja 50 %;

NOEC (stebimo poveikio nedaranti koncentracija) taikant šį metodą – didžiausia bandymo koncentracija, kuriai esant išmatuotas (-i) parametras (-ai) nerodo didelio augimo inhibavimo palyginti su kontrolinėmis vertėmis.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Gali būti daromas bandymas su etalonine medžiaga, kaip priemonė nustatyti netinkamas bandymo sąlygas. Jei naudojama etaloninė medžiaga, rezultatai turi būti pateikti ataskaitoje. Kaip etaloninę medžiagą galima naudoti kalio dichromatą.

1.4. **Bandymų metodo esmė**

Eksponentiškai augančios pasirinktų žaliųjų dumblių kultūros apibrėžtomis sąlygomis per kelias kartas veikiamos įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga. Nustatomas augimo inhibavimas palyginti su kontroline kultūra per apibrėžtą laiką.

1.5. **Kokybės kriterijai**

1.5.1. *Bandymo tinkamumo sąlygos*

Kontrolinių kultūrų ląstelių tankis per tris paras turėtų padidėti bent 16 kartų.

Bandomosios medžiagos pasišalinimas iš vandens į biomasę nebūtinai mažina bandymo tinkamumą.

1.6. **Bandymų metodo aprašymas**

1.6.1. *Pasirengimas*

1.6.1.1. Įranga ir medžiagos

— Įprastoji laboratorijos įranga.

— Atitinkamo tūrio bandymų kolbos (pvz., jei bandomojo tirpalo tūris 100 ml, tinka 250 ml tūrio kūginės kolbos).

— Kultūros auginimo aparatūra: spinta arba kamera, kurioje palaikomos temperatūros intervalas būtų 21–25 °C ± 2 °C tikslumu ir kurioje būtų užtikrintas nuolatinis tolygus apšvietimas 400–700 nm spektro bangų ilgio intervale. (Rekomenduojama, kad fotonų srautas būtų 0,72 × 10^{18} fotonų × m^{-2} × s^{-1} ± 20 %. Šis fotonų srautas yra lygus 120 µE × m^{-2} × s^{-1} ir gali būti gautas naudojant universalaus tipo baltas dienos šviesos lempas (spalvos temperatūra maždaug 4 200 K), kurių apšvietą, matuojant sferiniu kolektoriumi būtų maždaug 8 000 liuksų).

— Aparatūra ląstelių koncentracijai nustatyti, pvz., elektroninis dalelių skaitiklis, mikroskopas su skaičiavimo kamera, fluorimetras, spektrofotometras, kolorimetras. (*Pastaba*. Norint spektrofotometru gauti tinkamus matavimus esant mažai ląstelių koncentracijai, gali tekti naudoti kiuvetes, kurių šviesos kelio ilgis bent 4 cm).

1.6.1.2. Dumblių terpė

Rekomenduojama tokia terpė:

NH_4C1	15	mg/l
$MgCl_2 \times 6H_2O$	12	mg/l
$CaCl_2 \times 2H_2O$	18	mg/l
$MgSO_4 \times 7H_2O$	15	mg/l
KH_2PO_4	1,6	mg/l
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0,08	mg/l
$Na_2EDTA \times 2H_2O$	0,1	mg/l
H_3BO_3	0,185	mg/l
$MnCl_2 \times 4H_2O$	0,415	mg/l
$ZnCl_2$	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2 \times 6H_2O$	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l
$CuCl_2 \times 2H_2O$	10_5^-	mg/l
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	7×10^{-3}	mg/l
$NaHCO_3$	50	mg/l

Kai nusistovi pusiausvyra su oru, terpės pH vertė yra lygi maždaug 8.

Ši rekomendacija netrukdo naudoti kitas terpes, tačiau pagrindinių komponentų koncentracija turi atitikti šias ribines vertes:

P:	≤ 0,7 mg/l
N:	≤ 10 mg/l
chelantai	≤ 10^{-3} mmol/l
kietumas (Ca + Mg)	≤ 0,6 mmol/l

Šį reikalavimą atitinka rekomenduota terpė ir (1) nuorodoje pateikta terpė.

1.6.1.3. Bandymų organizmai

Rūšių atranka

Patariama naudoti greitai augančių žaliųjų dumblių rūšis, nes jas patogu auginti ir bandyti. Tinkamomis laikomos šios rūšys:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Jei naudojamos kitos rūšys, turi būti nurodytas štamas.

1.6.1.4. Bandymų schema

Pradinė ląstelių koncentracija

Rekomenduojama, kad pradinė bandymo kultūrų *Selenastrum capricornutum* ir *Scenedesmus subspicatus* ląstelių koncentracija būtų apie 10^4 ląstelių/ml. Kai naudojamos kitos rūšys, biomasės kiekis turėtų būti panašus.

Bandomosios medžiagos koncentracija

Koncentracijos verčių intervalas, kuriame galėtų pasireikšti poveikiai, yra nustatomas pagal intervalo nustatymo bandymo rezultatus. Bandymui imamos bent penkios geometrine progresija didėjančios koncentracijos. Mažiausios koncentracijos bandomoji medžiaga turi neveikti dumblių augimo. Didžiausios koncentracijos bandomoji medžiaga turi inhibuoti augimą bent 50 % palyginti su kontroliniu bandymu, ir būtų geriau, jei augimą stabdytų visiškai.

Lygiagrečių bandymų skaičius ir kontroliniai bandymai

Pagal bandymo schemą su kiekviena bandomąja koncentracija turi būti daromi trys lygiagretūs bandymai ir būtų gerai, jei kontrolinių bandymų skaičius būtų dvigubai didesnis. Jei pasiteisina, bandymo schemą galima keisti didinant koncentracijos verčių skaičių ir mažinant lygiagrečių bandymų vienai koncentracijai skaičių.

Jei bandomajai medžiagai soliubilizuoti naudojamas tirpiklis, į bandymo schemą turėtų būti įtrauktas papildomas kontrolinis bandymas, naudojant tirpiklio kiekį atitinkantį didžiausią naudotą koncentraciją.

1.6.2. *Bandymų eiga*

Šiame skyriuje pateiktos rekomendacijos, kaip bandyti gerai ir blogai tirpias bei lakiąsias medžiagas.

1.6.2.1. Gerai tirpių medžiagų bandymas

Bandymų kultūros, turinčios reikiamą bandomosios medžiagos koncentraciją ir dumblių sėjinio kiekį, ruošiamos alikvotinius bandomosios medžiagos ir dumblių suspensijos pradinių tirpalų tūrius skiedžiant filtruota dumblių terpe.

Kolbos su kultūra supurtomos ir statomos į kultūros auginimo aparatą. Darant bandymą būtina dumblius suspenduoti ir palengvinti CO_2 pernešimą. Tam galima naudoti purtymą, maišymą arba aeravimą. Kultūros turėtų būti laikomos esant 21–25 °C temperatūrai, nustatomai ± 2 °C tikslumu.

Kiekvienoje kolboje ląstelių koncentracija nustatoma bent po 24, 48 ir 72 valandų nuo bandymo pradžios. Filtruota dumblių terpė naudojama fonui nustatyti, jei naudojamas dalelių skaitiklis, arba ji naudojama kaip tuščiasis ėminys, kai ląstelių tankis matuojamas spektrofotometru.

pH vertė nustatoma bandymo pradžioje ir po 72 valandų.

Per visą bandymo laiką pH vertė kontroliniuose ėminiuose paprastai neturėtų pasikeisti daugiau kaip vienetu.

1.6.2.2. Blogai tirpių medžiagų bandymas

Jei bandomosios medžiagos tirpumas yra tos pačios eilės, kaip didžiausia bandyme naudota koncentracija, būtini tik nedideli nukrypimai nuo pirmiau aprašytos metodikos norint paruošti bandomuosius tirpalus. Sotusis tirpalas gali būti naudojamas kaip bandomosios medžiagos pradiniai tirpalai. Taikant kitą būdą, prieš pridedant dumblių suspensijos, dumblių terpėje ruošiamas norimos koncentracijos bandomosios medžiagos tirpalas.

Vandenyje blogai tirpių medžiagų pradiniai tirpalai gali būti ruošiami mechaniškai disperguojant arba naudojant dumbliams mažai toksiškus tirpiklius, pvz., organinius tirpiklius, emulsiklius arba dispergentus. Naudojant tirpiklius, koncentracija neturėtų būti didesnė kaip 100 mg/l, o į bandymo schemą turi būti įtraukti papildomi kontroliniai ėminiai, kuriuose tirpiklio koncentracija atitiktų didžiausią bandomųjų tirpalų koncentraciją.

1.6.2.3. Lakiųjų medžiagų bandymas

Iki šiol nėra visuotinai priimto būdo bandyti lakiąsias medžiagas. Jei žinoma, kad medžiaga turi polinkį garuoti, galima naudoti uždaras bandymų kolbas su padidintu laisvu tūriu virš tirpalo. Buvo pasiūlyti šio metodo variantai (žr. 1 nuorodą).

Reikia stengtis nustatyti tirpale likusios medžiagos kiekį, ir patariama ypač atsargiai interpretuoti bandymų rezultatus, gautus su lakiosiomis medžiagomis uždaroje sistemoje.

2. **DUOMENYS IR VERTINIMAS**

Išmatuotos ląstelių koncentracijos vertės bandomosiose kultūrose ir kontroliniuose bandiniuose, kartu su bandomosios medžiagos koncentracijomis ir matavimo laiku pateikiamos lentelėje. Norint gauti augimo kreives, vidutinė ląstelių koncentracijos vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai ir kontroliniuose bandiniuose vaizduojama grafiškai kaip laiko funkcija.

Koncentracijos ir jos poveikio priklausomybei įvertinti turėtų būti taikomi du toliau pateikti būdai.

2.1. **Plotų po augimo kreivėmis lyginimas**

Plotas po augimo kreivėmis gali būti apskaičiuotas taikant formulę:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

čia:

A = plotas,

N_0 = ląstelių skaičius laiku t_0 (bandymo pradžia),

N_1 = išmatuotas ląstelių skaičius/ml laiku t_1,

N_n = išmatuotas ląstelių skaičius/ml laiku t_n,

t_1 = pirmojo matavimo laikas nuo bandymo pradžios,

t_n = n-ojo matavimo laikas nuo bandymo pradžios.

Ląstelių augimo inhibavimo procentinės dalies vertė kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai (I_A) apskaičiuojama kaip ploto po kontrolinio bandymo augimo kreive (A_c) ir ploto po kiekvieną medžiagą atitinkančia augimo kreive (A_t) skirtumas:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

I_A vertės ir atitinkamos koncentracijos vertės žymimos pusiau logaritminiame arba pusiau logaritminiame tikimybiniame popieriuje. Jei vertės žymimos tikimybiniame popieriuje, per taškus iš akies brėžiama tiesė, arba galima brėžti apskaičiuotą regresijos tiesę, jei galima padaryti prielaidą apie lognormalinį verčių skirstinį.

EC_{50} vertė gaunama kaip (regresijos) tiesės ir abscisei lygiagrečios tiesės, atitinkančios 50 % inhibavimą (I_A = 50 %) susikirtimo taškas. Norint šią vertę pažymėti vienareikšmiai, kaip gautą šiuo skaičiavimo metodu, pasiūlyta vartoti simbolį E_bC_{50}. Taikant šį metodą, kuris nustato matavimą po 24, 48 ir 72 valandų, simbolis tampa E_bC_{50} (0–72 h).

Be to,, naudojant I_A kaip koncentracijos logaritmo funkcijos grafiką, galima gauti kitas vertes, pvz., E_bC_{10}.

2.2. **Augimo greičių lyginimas**

Vidutinis eksponentiškai augančių kultūrų savitasis augimo greitis (μ) gali būti apskaičiuotas pagal formulę:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Kitaip, vidutinio savitojo augimo greičio vertė gali būti gauta iš regresijos tiesės krypties koeficiento brėžiant N kaip laiko funkcijos grafiką.

Kiekvienai bandomosios medžiagos koncentracijai gauta savitojo augimo greičio mažėjimo procentinė vertė palyginti su kontroline verte brėžiama kaip koncentracijos logaritmo funkcija. Iš gauto grafiko galima gauti jų EC_{50} vertę. Norint vienareikšmiai pažymėti šiuo metodu gautą EC_{50}, pasiūlyta naudoti simbolį E_rC_{50}. Turi būti nurodytos matavimo laiko ribos, pvz., jei vertė gauta 24 ir 48 valandų laikotarpiui, simbolis užrašomas E_rC_{50} (24–48 h).

Pastaba. Savitasis augimo greitis yra logaritminis dydis, todėl nedideli augimo greičio pokyčiai gali būti didelio biomasės pokyčio priežastimi. Taigi E_bC ir E_rC skaitmeninės vertės nėra palyginamos.

3. **ATASKAITA**

Jei įmanoma, bandymų ataskaitoje turi būti pateikta tokia informacija:

— bandomoji medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys,

— bandymų organizmai: kilmė, laboratorinė kultūra, štamo numeris ir auginimo metodas,

— bandymų sąlygos:

  — bandymo pradžios ir pabaigos data bei jo trukmė,

  — temperatūra,

  — terpės sudėtis,

— kultūros auginimo aparatūra,

— tirpalų pH bandymo pradžioje ir pabaigoje (turi būti pateiktas aiškinimas, jei stebimas pH vertės nukrypimas yra didesnis kaip vienetas),

— tirpiklis ir metodas, taikytas bandomajai medžiagai soliubilizuoti, bei tirpiklio koncentracija bandomuosiuose tirpaluose,

— šviesos intensyvumas ir kokybė,

— bandomosios koncentracijos vertės (išmatuotos arba vardinės),

— rezultatai:

— ląstelių koncentracija kiekvienos kolbos kiekviename matavimo taške ir ląstelių koncentracijos nustatymo metodas,

— ląstelių koncentracijos vidutinės vertės,

— augimo kreivės,

— koncentracijos ir poveikio santykio grafinis vaizdavimas,

— EC vertės ir skaičiavimo metodas,

— NOEC,

— kiti pastebėti reiškiniai.

4. **NUORODOS**

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.

2. Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*", in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Priedėlis

DUMBLIŲ AUGINIMO METODIKOS PAVYZDYS

Bendrosios pastabos

Šio kultūros auginimo pagal pateikiamą metodiką tikslas yra gauti dumblių kultūras toksiškumo bandymams.

Norint užtikrinti, kad dumblių kultūros nebūtų užkrėstos bakterijomis, turi būti naudojami tinkami metodai (ISO 4833). Gali būti pageidaujama naudoti akseniškas kultūras, tačiau pagrindinės yra vienaląsčių dumblių kultūros.

Visi veiksmai turi būti daromi steriliomis sąlygomis, kad nebūtų užkrėsta bakterijomis ir kitais dumbliais.

Įranga ir medžiagos

Žr. 1.6.1. Pasirengimas ir bandymo organizmai.

Dumblių kultūros auginimo metodikos

Mitybinių tirpalų (terpės) ruošimas

Visų mitybinių terpių druskų tirpalai ruošiami kaip koncentruoti pradiniai tirpalai ir laikomi tamsoje ir šaltai. Tirpalai sterilizuojami filtravimu arba autoklave.

Terpė ruošiama pradinius mitybinių medžiagų koncentruotus tirpalus pilant į sterilų distiliuotą vandenį ir imantis priemonių infekcijai išvengti. Kietai terpei gauti dedama 0,8 % agaro.

Pradinė kultūra

Pradinės kultūros yra mažos dumblių kultūros, kurios reguliariai pernešamos į šviežią terpę, kad jas būtų galima naudoti kaip pradinę bandymų medžiagą. Jei kultūros reguliariai nenaudojamos, jos uždedamos ant gulsčiojo agaro mėgintuvėliuose. Šios kultūros pernešamos į šviežią terpę bent kartą per du mėnesius.

Pradinės kultūros auginamos kūginėse kolbose su atitinkama terpe (tūris apie 100 ml). Kai dumbliai inkubuojami 20 °C temperatūroje su pastoviu apšvietimu, pernešti reikia kas savaitę.

Į kolba su šviežia terpe sterilia pipete pernešamas toks „senos“ kultūros kiekis, kad greitai augančių rūšių atveju pradinė koncentracija būtų maždaug 100 kartų mažesnė nei senos kultūros.

Rūšių augimo greitis gali būti nustatytas iš augimo kreivės. Jei greitis žinomas, galima įvertinti, koks turi būti į naują terpę pernešamos kultūros tankis. Tai turi būti daroma anksčiau nei kultūra pasiekia žūties tarpsnį.

Iš anksto paruošta kultūra

Iš anksto paruošta kultūra skirta tam, kad būtų gautas bandomosioms kultūroms sėti reikalingas dumblių kiekis. Iš anksto paruošta kultūra inkubuojama bandymo sąlygomis ir naudojama tuomet, kai dar auga eksponentiškai, paprastai maždaug po trijų inkubavimo parų. Kai dumblių kultūroje pasitaiko deformuotos ar nenormalios ląstelės, jos turi būti pašalintos.

TOKSIŠKUMO SLIEKAMS MATAVIMAS

DIRBTINIO DIRVOŽEMIO BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Šiame laboratoriniame bandyme bandomoji medžiaga maišoma su dirbtiniu dirvožemiu, į kurį 14 parų dedami sliekai. Kai baigiasi šis laikas (ir neprivalomai po septynių parų), tiriama medžiagos įtaka sliekų mirtingumui. Bandyme pateiktas metodas, kaip daryti palyginus greitą atranką medžiagų, kurios per odą ir virškinimo traktą veikia sliekus.

1.2. **Apibrėžimas ir vienetas**

LC_{50}: apytikriai apskaičiuota koncentracija medžiagos, kurią naudojant per bandymų laiką žūsta 50 % bandymų gyvūnų.

1.3. **Etaloninė medžiaga**

Periodiškai naudojama etaloninė medžiaga, kaip priemonė parodyti, kad bandymų sistemos jautrumas žymiai nepakito.

Etalonine medžiaga rekomenduojama naudoti analiziškai gryną chloracetamidą.

1.4. **Bandymo esmė**

Dirvožemis yra nepastovi terpė, todėl šiame bandyme naudojamas tiksliai apibrėžtas dirbtinis priemolio dirvožemis. Suaugę *Eisenia foetida* rūšies sliekai (žr. papildymo pastabą) laikomi apibrėžtos sudėties dirbtiniame dirvožemyje, apdorotame įvairios koncentracijos bandomąja medžiaga. Indų turinys po 14 parų (ir neprivalomai po septynių parų) nuo bandymo pradžios yra pasklaidomas ant padėklo, ir kiekvienai naudotai koncentracijai skaičiuojami likę gyvi sliekai.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Bandymas projektuotas taip, kad atkuriamumas bandymo substrato ir organizmo atžvilgiu būtų kiek įmanoma geresnis. Mirtingumas kontroliniuose bandiniuose bandymo pabaigoje turi būti ne didesnis kaip 10 %, kitaip bandymas yra nevalidus.

1.6. **Bandymų metodo aprašymas**

1.6.1. *Medžiagos*

1.6.1.1. Bandymo substratas

Bandymo pagrindiniu substratu naudojamas apibrėžtas dirbtinis dirvožemis.

a) Pagrindinis substratas (procentinė sudėtis skaičiuojama sausos medžiagos masei)

— 10 % samanų durpių (pH reikšmė kiek įmanoma arčiau 5,5–6,0, be matomų augalų liekanų ir smulkiai maltų),

— 20 % kaolinito molio; pageidautina, kad kaolinito jame būtų daugiau kaip 50 %,

— apie 69 % pramoninio kvarco smėlio (daugiausia tai turi būti smulkus smėlis, kurio daugiau kaip 50 % dalelių dydis būtų nuo 0,05 iki 0,2 mm). Jei medžiagos dispergavimas vandenyje nepakankamas, kiekvienam bandymų indui reikėtų turėti 10 g smėlio, kurį vėliau būtų galima maišyti su bandomąja medžiaga,

— apie 1 % kalcio karbonato ($CaCO_3$), smulkiai malto, chemiškai gryno, dedamo padidinti pH vertę iki 6,0 ± 0,5.

b) Bandymų substratas

Bandymų substratas susideda iš pagrindinio substrato, bandomosios medžiagos ir dejonizuoto vandens.

Vanduo jame sudaro maždaug nuo 25 % iki 42 % sauso pagrindinio substrato masės. Vandens kiekis substrate nustatomas džiovinant bandinį 105 °C temperatūroje iki pastoviosios masės. Pagrindinis vertinimas, kiek reikia drėkinti dirbtinį dirvožemį, yra nesugerto vandens nebuvimas. Būtina rūpestingai maišyti, kad bandomoji medžiaga tolygiai būtų pasiskirstyta substrate. Bandomosios medžiagos įterpimo į substratą būdas turi būti nurodytas ataskaitoje.

c) Kontrolinis substratas

Kontrolinį substratą sudaro pagrindinis substratas ir vanduo. Jei naudojamas priedas, papildomame kontroliniame bandinyje turi būti toks pat priedo s kiekis.

1.6.1.2. Bandymų indai

Maždaug vieno litro talpos stiklinis indas (tinkamai uždengtas plastiko dangčiu, lėkštele ar plastiko plėvele su ventiliacijos angomis), užpildytas tokiu kiekiu drėgno bandymų substrato ar kontrolinio substrato, kuris atitiktų 500 g sauso substrato masę.

1.6.2. *Bandymų sąlygos*

Indai turi būti laikomi nuolat apšviestose klimato kamerose 20 ± 2 °C temperatūroje. Apšvieta turi būti nuo 400 iki 800 liuksų.

Bandymo trukmė – 14 parų, tačiau mirtingumą dar neprivalomai galima vertinti po septynių parų nuo bandymo pradžios.

1.6.3. *Bandymų eiga*

Bandomosios medžiagos koncentracijo vertės

Bandomosios medžiagos koncentracija skaičiuojama medžiagos mase sauso pagrindinio substrato masei (mg/kg).

Intervalo nustatymo bandymas

Norint turėti informaciją, kokias koncentracijas naudoti galutiniame bandyme, intervalo nustatymo bandyme gali būti nustatyta koncentracija, dėl kurios mirtingumas kinta nuo 0 iki 100 %.

Medžiaga turi būti išbandyta tokios koncentracijos: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg medžiagos/kilogramui bandymo substrato (sausos masės).

Jei turi būti daromas visas galutinis bandymas, tai intervalo nustatymo bandyme kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam bandymui be medžiagos pakaktų po vieną bandymų partiją, kurioje būtų 10 sliekų.

Galutinis bandymas

Intervalo nustatymo rezultatai naudojami parinkti bent penkias, geometrine progresija sudarančias koncentracijas, kurios apima tik mirtingumo intervalą nuo 0 iki 100 % ir skiriasi pastoviu daugikliu, ne didesniu kaip 1,8.

Bandymai, naudojant tokią koncentracijų seriją, turi leisti kiek įmanoma tiksliau įvertinti LC_{50} vertę ir jos pasikliovimo rėžius.

Galutiniame bandyme kiekvienai koncentracijai ir kontroliniam bandymui be medžiagos imamos bent keturios bandymų partijos, kurių kiekvienoje būtų 10 sliekų. Šių lygiagrečių bandymų rezultatai pateikiami vidutinės vertės ir standartinio nuokrypio pavidalu.

Kai dvi gretimos koncentracijos, kurių santykis 1,8, duoda tik 0 % ir tik 100 % mirtingumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC_{50}.

Pagrindinio bandymų substrato ir bandomosios medžiagos maišymas

Bandymų substratas turi būti gaminamas, kai tai įmanoma, be jokių priedų, išskyrus vandenį. Prieš pat bandymo pradžią bandomosios medžiagos emulsija ar dispersija dejonizuotame vandenyje ar kitame tirpiklyje sumaišoma su pagrindiniu bandymo substratu arba tolygiai ant jo užpurškiama plonu chromatografiniu ar panašios rūšies purkštuvu.

Jei medžiaga netirpsta vandenyje, ji gali būti ištirpinta kuo mažesniame tinkamo organinio tirpiklio tūryje (pvz., heksane, acetone ar chloroforme).

Bandomajai medžiagai soliubilizuoti, disperguoti ar emulguoti galima naudoti tik lengvai garuojančias medžiagas. Prieš naudojant bandymų substratas turi būti vėdinamas. Išgaravusio vandens kiekis turi būti papildytas. Kontroliniame bandinyje turi būti toks pat visų naudotų priedų kiekis.

Jei bandomoji medžiaga netirpsta, ir negali būti disperguota ar emulguota organiniuose tirpikliuose, 10 g smulkaus malto kvarco ir bandomosios medžiagos, kiek jos reikia 500 g sauso dirbtinio dirvožemio apdoroti, mišinys maišomas su 490 g sauso bandomojo substrato.

Kiekvienai bandymų partijai į stiklinį indą dedama šlapio bandymų substrato, atitinkančio 500 g sauso substrato, ir ant bandymų substrato viršaus dedama 10 sliekų, kurie prieš tai 24 valandas buvo kondicionuoti panašiame šlapiame pagrindiniame substrate, po to greitai nuplauti vandeniu, vandens perteklių sugeriant filtriniu popieriumi.

Indai dengiami perforuotu plastikiniu dangčiu, lėkštelę ar plėvele, kad substratas nedžiūtų, ir 14 parų laikomi bandymų sąlygomis.

Vertinimas turi būti daromas po 14 parų (ir neprivalomai po septynių parų) nuo bandymo pradžios. Substratas paskleidžiamas ant stiklinės ar nerūdijančio plieno plokštės. Sliekai apžiūrimi ir nustatomas gyvųjų sliekų skaičius. Sliekai laikomi negyvais, jei jie neatsako į švelnų mechaninį priekinio galo dirginimą.

Kai tikrinimas daromas po septynių parų, indas vėl užpildomas substratu, ir likę gyvi sliekai dedami ant to paties bandymų substrato viršaus.

1.6.4. *Bandymų organizmai*

Bandymų organizmai turi būti suaugę *Eisenia foetida* (žr. priedėlio pastabą) (bent dviejų mėnesių amžiaus su *clitellum*), drėgnų sliekų masė yra nuo 300 iki 600 mg. (Apie auginimo metodą žr. priedėlį.)

2. DUOMENYS

2.1. Rezultatų apdorojimas ir vertinimas

Ataskaitoje pateikiamos bandomosios medžiagos koncentracijos, su nuoroda į atitinkamą procentinį kiekį žuvusių sliekų.

Kai duomenys yra tinkami skaičiuoti, LC_{50} vertė ir pasikliovimo rėžiai ($p = 0,05$) turi būti nustatyti, taikant standartinius metodus (Litchfield and Wilcoxon, 1949, lygiaverčiam metodui). LC_{50} turi būti nurodyta mg bandomosios medžiagos vienam kilogramui (sauso) bandymų substrato.

Tais atvejais, kai koncentracijos kreivė yra per stati, kad būtų galima skaičiuoti LC_{50}, pakanka grafinio šios vertės įverčio.

Kai dvi gretimos koncentracijos, kurių santykis 1,8, duoda tik 0 % ir tik 100 % mirtingumą, šių dviejų verčių pakanka pažymėti intervalą, į kurį patenka LC_{50}.

3. ATASKAITA

3.1. Bandymų ataskaita

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— tvirtinimas, kad bandymas buvo daromas pagal aukščiau minėtus kokybės kriterijus,

— darytas bandymas (intervalo nustatymo bandymas ir (ar) galutinis bandymas),

— tikslus bandymo sąlygų aprašymas arba tvirtinimas, kad bandymas buvo darytas pagal metodą; turi būti nurodyti visi nukrypimai,

— tikslus aprašymas, kaip bandomoji medžiaga buvo įmaišyta į pagrindinį bandymo substratą,

— informacija apie bandymų organizmus (rūšį, amžių, masės vidutinę vertę ir intervalą, laikymo ir auginimo sąlygos, tiekėjas),

— metodas, taikytas nustatyti LC_{50},

— bandymų rezultatai, įskaitant visus naudotus duomenis,

— bandymų organizmų pastebėtų simptomų ar elgesio pokyčių aprašymas,

— mirtingumas kontroliniuose bandiniuose,

— LC_{50} ar didžiausia bandyta koncentracija, kurioje mirtingumas nulinis, ir mažiausia bandyta koncentracija, kurioje mirtingumas 100 %, 14 parų (ir neprivalomai septynios paros) nuo bandymo pradžios,

— koncentracijos ir atsako kreivės brėžinys,

— rezultatai, gauti su etalonine medžiaga, šiame bandyme ar iš ankstesniųjų kokybės kontrolės tyrimų.

4. NUORODOS

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Edwards, C. A. ir Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, London, 331 p.

3. Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 p.

4. Litchfield, J. T. ir Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.,* vol. 96, 1949, p. 99.

5. Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.

6. Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwunn *Eisenia foetida* in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

Priedėlis

Sliekų auginimas ir laikymas prieš bandymus

Norint auginti gyvūnus, į auginimo dėžę su šviežiai paruoštu substratu dedama nuo 30 iki 50 suaugusių sliekų, kurie išimami po 14 parų. Šiuos gyvūnus galima naudoti kitoms auginimo partijoms. Iš kokonų gauti sliekai bandymuose naudojami, kai subręsta (nurodytomis sąlygomis po dviejų ar trijų mėnesių).

Laikymo ir auginimo sąlygos

Klimato kamera:	temperatūra 20 ± 2 °C, geriau, jei nuolat apšviesta (apšvieta nuo 400 iki 800 liuksų).
Auginimo dėžės:	Tinkami negilūs 10–20 l tūrio indai.
Substratas:	*Eisenia foetida* gali būti veisiami įvairių gyvulių išmatose. Rekomenduojama auginimo terpe naudoti mišinį, kurį sudaro 50 % pagal tūrį durpės ir 50 % karvių ar arklių mėšlas. Terpės pH vertė turi būti nuo 6 iki 7 (reguliuojama kalcio karbonatu), savitasis joninis laidumas mažas (mažesnis nei 6 mohm ar druskos 0,5 % koncentracijos tirpalo).
	Substratas turi būti drėgnas, bet ne per šlapias.
	Be aukščiau pateikto metodo galima naudoti kitus sėkmingus būdus.

Pastaba. *Eisenia foetida* yra dviejų veislių, kurias kai kurie taksonomijos specialistai išskyrė į rūšis (Bouche, 1972). Šios veislės morfologiškai yra panašios, tačiau viena jų – *Eisenia foetida foetida* – ant segmentų turi tipiškus skersus dryžius ar juostas, o kita – *Eisenia foetida anderei* – to neturi ir yra margos rausvos spalvos. Jei įmanoma, turi būti naudojama *Eisenia foetida andrei*. Galima naudoti ir kitas rūšis, jei yra reikiamos metodikos.

BIOLOGINIS SKAIDYMAS

ZAHN-WELLENS BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Metodo tikslas yra įvertinti vandenyje tirpių, nelakių organinių medžiagų galimą suskaidymą, kai jas statiniame bandyme veikia palyginti didelės koncentracijos mikroorganizmai.

Ant suspenduotų kietųjų dalelių gali vykti fizikocheminė adsorbcija, ir į tai turi būti atsižvelgta interpretuojant rezultatus (žr. 3.2).

Tiriamos medžiagos naudojamos tokios koncentracijos, kad ji atitiktų DOC vertes intervale nuo 50 iki 400 mg/litre ar COD vertes nuo 100 iki 1 000 mg/litre (DOC = ištirpusi organinė anglis; COD = cheminis deguonies poreikis). Šios palyginti didelės koncentracijos turi analizinio patikimumo pranašumą. Junginiai, kurie turi toksiškų savybių, gali lėtinti arba inhibuoti skaidymo procesą.

Bandomosios medžiagos biologiniam suskaidymui įvertinti šiame bandyme taikomas ištirpusios organinės anglies koncentracijos arba cheminio deguonies poreikio matavimas.

Jei lygiagrečiai taikyti specifinį analizės metodą, gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurios bandyme naudojamos koncentracijos:

— tirpios vandenyje bandymų sąlygomis,

— garų slėgis bandymo sąlygomis yra labai mažas,

— neinhibuoja bakterijų,

— bandymų sistemoje adsorbuojamos tik ribotu laipsniu,

— iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymūs, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti mažus rezultatus ir pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

1.2. **Apibrėžimai ir vienetai**

Bandymo pabaigoje pasiektas skaidymo lygis ataskaitoje pateikiamas kaip „Biologinis skaidomumas Zahn-Wellens bandyme“:

$$D_T\ (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

čia:

D_t = biologinis skaidymas (%) laiku T,

C_A = DOC (ar COD) vertės bandomajame mišinyje po trijų valandų nuo bandymo pradžios (mg/l) (DOC = ištirpusi organinė anglis, COD = cheminis deguonies poreikis),

C_T = DOC ar COD vertės bandomajame mišinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

C_B = DOC ar COD vertė tuščiajame bandinyje bandinio ėmimo metu (mg/l),

C_{BA} = DOC ar COD vertė tuščiajame bandinyje, išmatuota po trijų valandų nuo bandymo pradžios (mg/l).

Skaidymo laipsnis apvalinamas iki artimiausio sveikojo procentų skaičiaus.

Skaidymo procentinė vertė nurodoma kaip bandomosios medžiagos DOC (ar COD) pašalinimo procentinė vertė.

Skirtumas tarp skaidymo vertės, išmatuotos po trijų valandų, ir paskaičiuotos, bet geriau išmatuotos, pradinės vertės gali suteikti naudingos informacijos apie medžiagos šalinimą (žr. 3.2. Duomenų interpretavimas).

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Kai kuriais atvejais, kai tiriamos naujos medžiagos, etaloninės medžiagos gali būti naudingos, tačiau specifinės etaloninės medžiagos vis dar negali būti rekomenduotos.

1.4. **Bandymų metodo esmė**

Aktyvusis dumblas, mineralinė mitybinė terpė ir bandomoji medžiaga, kaip vienintelis anglies šaltinis vandeniniame tirpale, dedami kartu į vieno keturių litrų tūrio stiklinį indą, turinti maišiklį ir aeratorių. Mišinys ne ilgiau kaip 28 paras maišomas ir aeruojamas 20–25 °C temperatūroje išsklaidytoje šviesoje arba tamsioje patalpoje. Skaidymo procesas kontroliuojamas, nustatant DOC (ar COD) vertes filtruotame tirpale kasdieną ar per kitokį tinkamą vienodą laiko tarpą. Po kiekvieno matavimo nustatytos DOC (ar COD) pašalinimo vertės santykis su verte, gauta po trijų valandų nuo bandymo pradžios, reiškiamas procentine biologinio skaidymo verte ir yra naudojamas kaip tam momentui nustatytas skaidymo laipsnio matas. Rezultatas atidedamas *kaip* kitimas laike ir gaunama biologinio skaidymo kreivė.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos mažėjimą dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidomumas).

1.5. **Kokybės kriterijai**

Tarplaboratorinio lyginimo bandymas parodė, kad šio metodo atkuriamumas yra patenkinamas.

Metodo jautrumą dideliu laipsniu lemia tuščiojo bandinio kintamumas ir, kiek mažiau, ištirpusios anglies nustatymo preciziškumas ir bandomosios medžiagos kiekis skystyje.

1.6. **Bandymų metodikos aprašymas**

1.6.1. *Pasirengimas*

1.6.1.1. Reagentai

Bandymų vanduo: geriamasis vanduo, kuriame organinės anglies kiekis < 5 mg/litre. Bendra kalcio ir magnio jonų koncentracija neturi būti didesnė kaip 2,7 mmol/litre; priešingu atveju, reikia atitinkamai skiesti dejonizuotu arba distiliuotu vandeniu.

Sieros rūgštis, analizinis reagentas (A.R.):	50 g/l,
Natrio hidroksido tirpalas A.R.:	40 g/l,
Mineralinis mitybinis tirpalas: viename litre dejonizuoto vandens ištirpinkite:	
amonio chlorido, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g,
natrio dihidrofosfato, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$, A.R.:	33,4 g,
kalio dihidrofosfato, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g,
kalio hidrofosfato, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g.

Mišinys naudojamas ir kaip mitybinė, ir kaip buferuojanti terpė.

1.6.1.2. Aparatūra

Nuo vieno iki keturių litrų talpos stikliniai indai (pvz., cilindriniai indai).

Maišymo įtaisas su stikliniu ar metaliniu maišikliu ant tinkamo ilgio veleno (maišiklis turi suktis maždaug 5–10 cm virš indo dugno). Vietoj jo galima naudoti magnetinį maišiklį su 7–10 cm ilgio magnetu.

Stiklinis vamzdis, kurio vidinis skersmuo 2–4 mm, orui tiekti. Vamzdžio anga turi būti maždaug 1 cm aukštyje virš indo dugno.

Centrifuga (apie 3 550 *g*).

pH-metras.

Ištirpusio deguonies matuoklis.

Popieriniai filtrai.

Membraninio filtravimo aparatas.

Membraniniai filtrai, akučių dydis 0,45 μm. Membraniniai filtrai tinka, jei užtikrinama, kad filtravimo pakopoje jie neišskiria anglies ir nesugeria medžiagos.

Analizės įranga organinės anglies kiekiui ir cheminiam deguonies poreikiui nustatyti.

1.6.1.3. Sėjimo kultūros ruošimas

Aktyvusis dumblas iš biologinio valymo įrenginio yra plaunamas (kelis kartus), centrifuguojant arba nusodinant iš bandymų vandens (anksčiau).

Aktyvusis dumblas turi būti atitinkamos būsenos. Tokio dumblo yra tinkamai veikiančiame nuotekų valymo įrenginyje. Norint gauti kiek įmanoma daugiau įvairių bakterijų rūšių ar štamų, gali būti geriau maišyti skirtingų šaltinių sėjimo kultūras (pvz., skirtingų valymo įrenginių, dirvožemio ekstraktų, upės vandens ir t. t.). Mišinys turi būti apdorojamas, kaip aprašyta anksčiau.

Kaip tikrinti aktyviojo dumblo aktyvumą, žr. „Funkcinė kontrolė“, toliau.

1.6.1.4. Bandomųjų tirpalų ruošimas

Į bandymo indą įpilkite 500 ml bandymų vandens, 2,5 ml/litre mineralinio mitybinio tirpalo ir tiek aktyviojo dumblo, kad galutiniame mišinyje sausosios medžiagos būtų nuo 0,2 iki 1,0 g/litre. Įpilkite pakankamą kiekį pradinio bandomosios medžiagos tirpalo, kad DOC galutiniame mišinyje būtų nuo 50 iki 400 mg/litre. Atitinkamos COD vertės yra nuo 100 iki 1 000 mg/litre. Praskieskite bandymų vandeniu iki bendrojo tūrio nuo vieno iki keturių litrų. Tai, kokį bendrąjį tūrį pasirinkti, priklauso nuo bandinių skaičiaus, kurie bus imami DOC ar COD nustatyti, ir nuo analizės metodikai reikalingo tūrio.

Paprastai galima laikyti, kad pakanka dviejų litrų tūrio. Kiekvienai bandymų serijai lygiagrečiai ruošiamas bent vienas kontrolinis indas (su tuščiuoju bandiniu); jame yra tik aktyviojo dumblo ir mineralinio mitybinio tirpalo, praskiestų su bandymų vandeniu iki to paties tūrio, kaip ir induose su bandomąja medžiaga.

1.6.2. *Bandymo eiga*

Išsklaidytoje šviesoje ar tamsioje patalpoje 20–25 °C temperatūroje laikomų bandymo indų turinys maišomas magnetinėmis maišyklėmis ar sraigtiniais maišytuvais. Aeruojama suslėgtuoju oru, valomu leidžiant per medvilnės filtrą ir, jei būtina, per plovimo kolbą. Reikia užtikrinti, kad dumblas nenusistotų, o deguonies koncentracija būtų ne mažesnė kaip 2 mg/litre.

pH vertė turi būti tikrinama vienodais laiko tarpais (pvz., kasdien) ir, jei būtina, pH vertė nustatoma nuo 7 iki 8.

Garavimo nuostoliai reikiamais kiekiais kompensuojami dejonizuotu ar distiliuotu vandeniu prieš kiekvieną bandinio ėmimą. Gerai būtų pažymėti skysčio lygį ant indo sienelės prieš bandymo pradžią. Naujos žymės daromos po kiekvieno bandinio ėmimo (neaeruojant ir nemaišant). Norint aptikti bandomosios medžiagos adsorbciją aktyviuoju dumblu, pirmieji bandiniai, visuomet imami po trijų valandų nuo bandymo pradžios.

Bandomosios medžiagos šalinimas sekamas, darant kasdien ar kitais vienodais laiko tarpais DOC ar COD nustatymą. Bandiniai iš bandymų ir tuščiojo bandymo indų filtruojami per kruopščiai išplautą popieriaus filtrą. Pirmieji bandomojo tirpalo filtrato 5 ml pilami lauk. Sunkiai filtruojamas dumblas gali būti prieš tai pašalintas 10 minučių centrifugavimu. DOC ir COD nustatymas daromas bent po du kartus. Bandymo trukmė ne daugiau kaip 28 paros.

Pastaba. Jei bandiniai lieka drumsti, jie filtruojami per membraninius filtrus. Membraniniai filtrai neturi išskirti ar adsorbuoti jokių organinių medžiagų.

Aktyviojo dumblo veikimo tikrinimas

Norint patikrinti funkcinę aktyviojo dumblo gebą, lygiagrečiai kiekvienai bandymų serijai turi būti atliekamas bandymas su žinoma medžiaga. Buvo nustatyta, kad šiam tikslui tinka dietilenglikolis.

Adaptavimas

Jei analizė daroma palyginti dažnai (pvz., kasdien), adaptavimą galima aiškiai atpažinti iš skaidymo kreivės (žr. 2 paveikslą). Todėl bandymas neturi būti pradedamas prieš pat savaitgalį.

Jei adaptavimas įvyksta laikotarpio pabaigoje, bandymą galima pratęsti, kol skaidymas bus baigtas.

Pastaba. Jei reikia daugiau žinių apie adaptuoto dumblo elgesį, tas pats aktyvusis dumblas dar kartą naudojamas su ta pačia bandomąja medžiaga pagal tokią metodiką:

Išjunkite maišytuvą ir aeratorių ir leiskite dumblui nusistoti. Skystį virš dumblo nusiurbkite, įpilkite ne daugiau kaip du litrus bandymų vandens, 15 minučių maišykite ir leiskite vėl nusistoti. Skystį virš dumblo nusiurbkite dar kartą, likusį dumblą naudokite bandymui su ta pačia medžiaga pagal 1.6.1.4 ir 1.6.2 pakartoti. Vietoj nusodinimo, aktyvųjį dumblą galima atskirti centrifugavimu.

Adaptuotas dumblas gali būti sumaišomas su šviežiu dumblu, kad sausos medžiagos koncentracija būtų nuo 0,2 iki 1 g/litre.

Analizės priemonės

Paprastai bandiniai filtruojami per kruopščiai išplautą filtrinį popierių (plaukite dejonizuotu vandeniu).

Bandiniai, kurie lieka drumsti, filtruojami per membraninį filtrą (0,45 μm).

DOC koncentracija bandinių filtratuose (pirmieji 5 ml pilami lauk) nustatoma du kartus naudojant TOC nustatymo aparatūra. Jei filtrato negalima analizuoti tą pačią dieną, iki kitos dienos jis turi būti laikomas šaldytuve. Ilgiau laikyti nerekomenduojama.

COD koncentracija bandinio filtratuose nustatoma su COD analizės įranga, taikant toliau 2 nuorodoje aprašytą metodiką.

2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

DOC ir (ar) COD koncentracija bandiniuose, gautuose pagal 1.6.2, nustatoma bent po du kartus. Skaidymas laiku T apskaičiuojamas pagal formulę (su apibrėžimais), pateiktą 1.2 aukščiau.

Skaidymo laipsnis apvalinamas iki artimiausio sveikojo procentų skaičiaus. Bandymo pabaigoje pasiekto skaidymo procentinė vertė ataskaitoje pateikiama kaip „Biologinis skaidomumas Zahn-Wellens bandyme“.

Pastaba. Jei medžiaga visiškai suskaidoma dar nesibaigus bandymams skirtam laikui ir rezultatą patvirtina kitą dieną padaryta dar viena analizė, bandymą galima baigti.

3. ATASKAITA

3.1. Bandymų ataskaita

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— pradinė medžiagos koncentracija,

— visa kita informacija ir bandymų rezultatai, susiję su bandomąja medžiaga, etalonine medžiaga, jei buvo naudota, ir tuščiuoju bandymu,

— koncentracija po trijų valandų,

— biologinio skaidymo kreivė su aprašymu,

— data ir vieta, kur buvo imti bandymų organizmai, adaptavimo būsena, naudota koncentracija ir t. t.,

— mokslinis bet kokių bandymų metodikos keitimų pagrindimas.

3.2. Duomenų interpretavimas

Dienas ar savaites vykstantis laipsniškas DOC (COD) šalinimas rodo, kad medžiaga biologiškai skaidoma.

Tačiau kai kuriais atvejais gali vykti fizikocheminė adsorbcija ir tai matyti, kai nuo bandymo pradžios per pirmąsias tris valandas vyksta dalinis ar visiškas pašalinimas, o skirtumas tarp kontrolinio ir bandomojo skysčių virš dumblo išlieka netikėtai mažas.

Jei reikia atskirti biologinį skaidymą (ar dalinį biologinį skaidymą) ir adsorbciją, būtina daryti tolesnius bandymus.

Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) sėjimo kultūra naudoti skystį virš dumblo ar dumblą.

Bandomosios medžiagos, kurių neadsorbcinio DOC (COD) šalinimo vertes bandyme yra didelės, turi būti laikomos potencialiai biologiškai skaidomomis. Dalinis neadsorbcinis šalinimas rodo, kad cheminė medžiaga bent kažkiek yra biologiškai skaidoma. Mažos ar nulinės DOC (COD) šalinimo vertės gali būti dėl mikroorganizmų inhibavimo bandomąja medžiaga, tai dar gali parodyti dumblo irimas ir jo praradimas, dėl ko skystis virš dumblo drumsčiasi. Bandymas turi būti pakartotas naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Naudojant specifinį junginio analizės metodą ar bandomąsias medžiagas su žymėtais ^{14}C atomais, gali būti pasiektas didesnis jautrumas. Jei bandomasis junginys turi ^{14}C, $^{14}CO_2$ surinkimas patvirtintų, kad biologinis skilimas įvyko.

Kai duomenys pateikiami, kaip pirminio biologinio skaidymo rezultatai, turi būti paaiškinta, jei tai įmanoma, kaip pakito cheminė sandara, kad neliko pradinės bandomosios medžiagos atsako.

Turi būti pateiktas analizės metodo galiojimo patvirtinimas ir tuščiojo bandinio terpėje nustatyta skaidymo vertė.

4. **NUORODOS**

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEB, *Official Journal of the European Communities*, No L 251, 19. 9. 1984.

Priedėlis

VERTINIMO PAVYZDYS

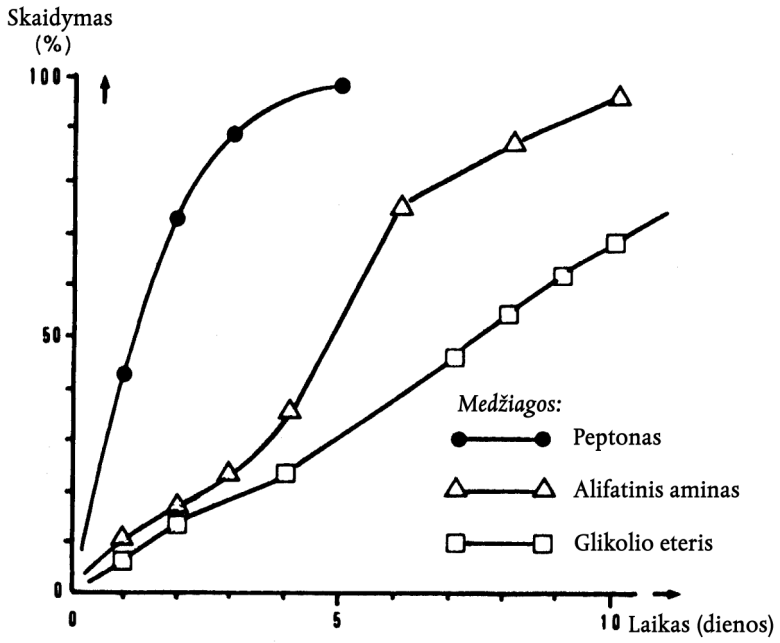
Organinis junginys:	4-Etoksibenzenkarboninė rūgštis
Teorinė bandomoji koncentracija:	600 mg/l
Teorinis DOC kiekis:	390 mg/l
Sėjimo kultūra	Nuotekų valymo įrenginys...
Koncentracija:	1 gramas sausos medžiagos/litre
Adaptavimo būsena:	neadaptuotas
Analizė:	DOC nustatymas
Bandinio kiekis:	3 ml
Kontrolinė medžiaga:	Dietilenglikolis
Junginio toksiškumas:	Nėra toksiškumo požymių, kai jo mažiau kaip 1 000 mg/l Taikytas bandymas: Fermentavimo mėgintuvėlių bandymas

Bandymo trukmė	Kontrolinė medžiaga				Bandomoji medžiaga		
	Tuščiojo bandinio DOC [1] mg/l	DOC [1] mg/l	DOC tikrasis kiekis mg/l	Skaidymas %	DOC [1] mg/l	DOC tikrasis kiekis mg/l	Skaidymas %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 valandos	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 para	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 paros	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 paros	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 paros	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 paros	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 paros	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 paros	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 parų	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

[1] Trijų matavimų vidutinė vertė.

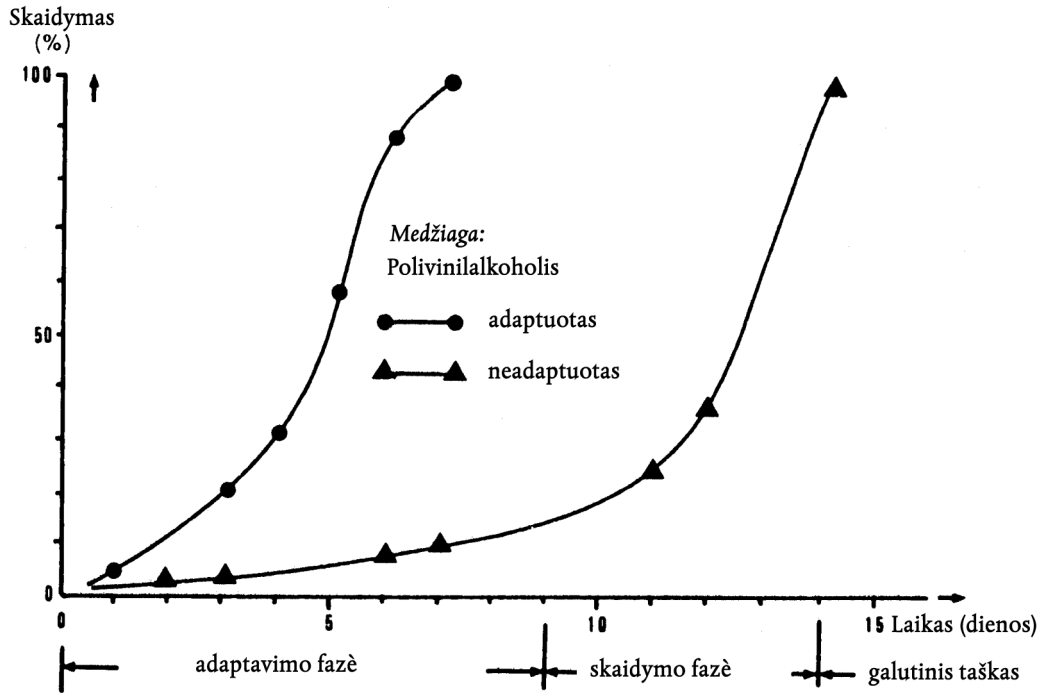
1 paveikslas

Biologinio skaidymo kreivių pavyzdžiai



2 paveikslas

Dumblo adaptavimo pavyzdžiai



BIOLOGINIS SKAIDYMAS

AKTYVIOJO DUMBLO MODELIAVIMO BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

1.1.1. *Bendrosios pastabos*

Metodas tinka tik toms organinėms medžiagoms, kurios bandyme naudojamos koncentracijos:

— vandenyje yra tirpios tiek, kad pakanka ruošti bandomuosius tirpalus,

— garų slėgis bandymo sąlygomis yra labai mažas,

— neinhibuoja bakterijų.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymūs, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti mažus rezultatus ir pasirinkti tinkamas bandomąsias koncentracijas, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

1.1.2. *Biologinio suskaidomumo nustatymas (DOC/COD analizė)*

Metodo tikslas yra nustatyti biologinį suskaidomumą, matuojant medžiagos ir bet kurių jos metabolitų šalinimą aktyviojo dumblo įrenginio modelyje, kai medžiagos koncentracija didesnė kaip > 12 mg DOC/litre (ar maždaug 40 mg COD/litre); manoma, kad 20 mg DOC/litre koncentracija yra optimali (DOC = ištirpusi organinė anglis; COD = cheminis deguonies poreikis).

Turi būti nustatytas organinės anglies kiekis bandomojoje medžiagoje (ar cheminis deguonies poreikis).

1.1.3. *Pirminio biologinio skaidomumo nustatymas (specifinė analizė)*

Metodo tikslas yra nustatyti pirminį medžiagos biologinį skaidomumą aktyviojo dumblo įrenginio modelyje, taikant specifinį analizės metodą, kai medžiagos koncentracija yra apie 20 mg/litre (galima naudoti didesnę ar mažesnę koncentraciją, jei tai leidžia analizės metodas ir toksiškumo sumetimai). Tai leidžia įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidomumą (pradinės cheminės sandaros junginio išnykimą).

Šio metodo tikslas *nėra* nustatyti bandomosios medžiagos mineralizavimą.

Būtina turėti atitinkamą analizės metodą bandomajai medžiagai nustatyti.

1.2. **Apibrėžimai ir vienetai**

1.2.1. *DOC/COD analizė*

Medžiagos šalinimo laipsnis reiškiamas lygtimi:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\,\% \qquad [1\ (a)]$$

čia:

DR = bandomosios medžiagos šalinimo laipsnis procentais DOC (ar COD) per duotą sulaikymo trukmę,

T = bandomosios medžiagos koncentracija intakyje, mg DOC/litre (ar mg COD/litre),

E = DOC (ar COD) koncentracija bandymų įrenginio ištakyje, mg DOC/litre (ar mg COD/litre),

E_o = be medžiagos veikiančio bandymo įrenginio ištakio DOC (ar COD) koncentracija, mg DOC/litre (ar mg COD/litre).

Skaidymas pateikiamas, nurodant bandomosios medžiagos DOC (ar COD) šalinimo per duotą sulaikymo trukmę procentinę vertę.

1.2.2. *Specifinė analizė*

Bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės fazės procentinė vertė (R_w) duotos vidutinės sulaikymo trukmės ribose skaičiuojama pagal lygtį:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [l(b)]$$

čia:

C_I = medžiagos koncentracija bandymo įrenginio intake (medžiagos kiekis mg/litre, nustatant specifinės analizės metodu),

C_O = medžiagos koncentracija bandymo įrenginio ištakyje (medžiagos kiekis mg/litre, nustatant specifinės analizės metodu).

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Kai kuriais atvejais, kai tiriamos naujos medžiagos, etaloninės medžiagos gali būti naudingos, tačiau specifinės etaloninės medžiagos vis dar negali būti rekomenduotos.

1.4. **Bandymų metodo esmė**

Biologiniam suskaidomumui nustatyti lygiagrečiai atliekami bandymai dviejuose eksperimentiniuose aktyviojo dumblo įrenginiuose (OECD patvirtinamasis bandymas ar akytojo indo įrenginiai). Bandomoji medžiaga dedama į intaką vieno iš įrenginių (sintetinių ar buitinių nuotekų), tuo tarpu į antrąjį įrenginį tiekiamos tik nuotekos. Pirminiam biologiniam skaidymui nustatyti, darant specifinę medžiagos analizę intake ir ištakyje, naudojamas tik vienas įrenginys.

DOC (ar COD) koncentracijos matuojamos ištakiuose, arba medžiagos koncentracija nustatoma darant specifinę analizę.

DOC atsiradusi dėl bandomosios medžiagos nematuojama, bet paprasčiausiai konstatuojamas jos kiekis.

Kai daromi DOC (ar COD) matavimai, vidutinių koncentracijų bandomajame ir kontroliniame ištakiuose skirtumas priskiriamas nesuskaidytai bandomajai medžiagai.

Kai daroma specifinė analizė, galima išmatuoti pradinio junginio molekulių koncentracijos pokytį (pirminis biologinis skaidymas).

Įrenginiai gali būti eksploatuojami „sudvejintų įrenginių režimu“, taikant persėjimo (transinokuliacijos) metodiką.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Pradinė medžiagos koncentracija priklauso nuo taikomo analizės metodo ir jo apribojimų.

1.6. **Bandymų metodo aprašymas**

1.6.1. *Pasirengimas*

1.6.1.1. Aparatūra

Reikia dviejų to paties tipo įrenginių, išskyrus tą atvejį, kai daroma specifinė analizė. Gali būti naudojami dviejų tipų įrenginiai:

OECD patvirtinamojo bandymo

Įrangą (1 papildymas) sudaro indas sintetinėms nuotekoms laikyti (A), dozavimo siurblys (B), aeravimo indas C, nusodintuvas D, aeroliftinis siurblys E, aktyviajam dumblui recirkuliuoti, ir apdoroto ištakio rinktuvas F.

A ir F indai turi būti iš stiklo ar tinkamo plastiko ir jų talpa turi būti bent 24 litrai. B siurblys turi užtikrinti nuolatinį sintetinių nuotekų srautą į aeravimo indą; galima naudoti bet kurį tinkamą įrenginį, svarbu, kad būtų užtikrintas tiekimo srautas ir koncentracija.

Normalaus darbo metu nustatomas toks D nusodintuvo aukštis, kad maišomo skysčio tūris aeravimo inde būtų trys litrai. Sukepinto stiklo aeravimo kubas G yra pakabintas C indo kūginėje viršūnėje. Per aeratorių pučiamo oro kiekį galima kontroliuoti debitmačiu.

Aeroliftinis siurblys E reguliuojamas taip, kad aktyvusis dumblas iš nusodintuvo tolygiai ir nuolat grąžinamas į aeravimo indą C.

„Akytas indas“

Akytasis indas yra pagamintas iš akyto polietileno lakštų (2 mm storio, didžiausias akučių dydis 95 μm), kurie susukami į 14 cm skersmens cilindrą su kūginių 45° pagrindu (2 papildymo 1 ir 2 paveikslai). Akytas indas dedamas į iš tinkamo plastiko pagamintą 15 cm skersmens nepraleidžiantį indą, cilindrinėje dalyje 17,2 cm aukštyje turinčiame išleidžiamąją angą, kuri nustato skysčio tūrį inde (3 litrai). Vidinio indo viršutinė dalis apjuosta standžiu laikančiuoju žiedu iš tinkamo plastiko, taip kad tarp vidinio ir išorinio indų yra 0,5 cm ištakiui skirta erdvė.

Akytąjį indą galima įtaisyti ant termostatuojamos vandens vonios dugno. Per vidinio indo dugną, ant kurio uždėti tinkami difuzoriai, tiekiamas oras.

A ir E indai turi būti iš stiklo ar tinkamo plastiko ir jų talpa turi būti bent 24 litrai. B siurblys turi užtikrinti nuolatinį sintetinių nuotekų srautą į aeravimo indą; galima naudoti bet kurį tinkamą įrenginį, svarbu, kad būtų užtikrintas tiekimo srautas ir koncentracija.

Reikia turėti atsarginius vidinius akytuosius indus, kad būtų galima pakeisti bet kurį užkimštą indą; užkimšti indai 24 valandas plaunami hipochlorito tirpale, po to gerai išplaunami vandentiekio vandeniu.

1.6.1.2. Filtravimas

Membraninio filtravimo aparatūra ir membraniniai filtrai, kurių akučių dydis 0,45 μm. Tinka tokie membraniniai filtrai, kurie neišskiria anglies ir filtravimo pakopoje neabsorbuoja medžiagos.

1.6.1.3. Nuotekos

Galima naudoti atitinkamą sintetinę mitybinę terpę ar buitines nuotekas.

Sintetinės mitybinės terpės pavyzdys

Viename litre vandentiekio vandens ištirpinkite:

Peptono:	160 mg,
Mėsos ekstrakto:	110 mg,
Karbamido:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	4 mg,
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Buitinės nuotekos

Buitinės nuotekos turi būti kasdieną iš naujo imamos iš nuotekų valymo įrenginio, kuris daugiausia valo buitines nuotekas, pirminio nusodintuvo perpildos srauto.

1.6.1.4. Bandomosios medžiagos pradinis tirpalas

Bandymo įrenginiui papildyti bandomąja medžiagą turi būti ruošiamas jos tirpalas, pvz., 1 %. Norint žinoti, kokį bandomosios medžiagos tirpalo tūrį reikia pilti į nuotekas ar tiesiai antruoju siurblių į įrenginį, kad būtų gauta reikiama bandomoji koncentracija, turi būti nustatyta bandomosios medžiagos koncentracija.

1.6.1.5. Sėjimo kultūra

Pastaba. Naudojant buitines nuotekas, nėra prasmės naudoti sėjimo kultūrą su maža bakterijų koncentracija, bet galima naudoti aktyvųjį dumblą.

Galima naudoti įvairias sėjimo kultūras.

Pateikiami trys sėjimo kultūros pavyzdžiai:

a) sėjimo kultūra iš antrinio ištakio

Sėjimo kultūra turi būti gauta iš geros kokybės antrinio ištakio, renkant ją valymo įrenginyje, į kurį daugiausia patenka buitinės nuotekos. Nuo bandinio ėmimo iki naudojimo ištakis turi būti laikomas aerobinėmis sąlygomis. Ruošiant sėjimo kultūrą, bandinys filtruojamas per stambų filtrą ir pirmieji 200 ml filtrato pilami lauk. Kol bus panaudotas, filtratas laikomas aerobinėmis sąlygomis. Sėjimo kultūra turi būti panaudota ėmimo dieną. Sėjimo kultūros dedama bent 3 ml.

b) sudėtinė sėjimo kultūra

Sėjimo kultūra iš antrinio ištakio:

žr. aprašymą aukščiau.

Sėjimo kultūra iš dirvožemio:

100 g sodo dirvožemio (derlingo, nesterilaus) suspenduojama 1000 ml geriamojo chloro neturinčio vandens. (Netinka dirvožemiai, kurių didelė dalis yra molis, smėlis ar juodžemis). Po sumaišymo suspensija 30 minučių paliekama nusistoti. Skystis virš nuosėdų filtruojamas per stambų filtrinį popierių, pirmuosius 200 ml pilant lauk. Filtratas aeruojamas iš karto ir visą laiką, kol bus panaudotas. Sėjimo kultūra turi būti panaudota ėmimo dieną.

Sėjimo kultūra iš paviršinio vandens:

Dar viena sėjimo kultūros dalis imama, siurbiant mezosaprobinio paviršinio vandens bandinį. Bandinys filtruojamas per stambų filtrinį popierių, pirmuosius 200 ml pilant lauk. Kol bus panaudotas, filtratas laikomas aerobinėmis sąlygomis. Sėjimo kultūra turi būti panaudota ėmimo dieną.

Vienodi trijų dalinių sėjimo kultūrų bandinių tūriai sujungiami, gerai sumaišomi, ir iš šio mišinio imama galutinė sėjimo kultūra. Sėjimo kultūros dedama bent 3 ml.

c) sėjimo kultūra iš aktyviojo dumblo

Sėjimo kultūrai galima naudoti aktyvųjį dumblą (suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija ne didesnė kaip 2,5 g/litre), kurio tam tikras tūris (ne didesnis kaip 3 litrai) imamas iš valymo įrenginio, kuris valo daugiausia buitines nuotekas, aeravimo tanko.

1.6.2. *Darbo eiga*

Bandymas daromas kambario temperatūroje; pastaroji turi būti nuo 18 iki 25 °C.

Jei tinka, bandymą galima daryti mažesnėje temperatūroje (iki 10 °C); jei medžiaga tokioje temperatūroje suiro, paprastai daugiau nereikia nieko daryti. Tačiau, jei medžiaga nesuiro, bandymas turi būti daromas pastovioje temperatūroje nuo 18 iki 25 °C.

1.6.2.1. Įdirbimo laikotarpis: dumblo formavimas/įrenginio stabilizavimas

Dumblo augimo/stabilizavimo laikotarpis, per kurį aktyviojo dumblo suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija ir įrenginio veikimas naudojamomis darbo sąlygomis artėja prie nuostoviosios būsenos.

Įdirbimo laikotarpis tęsiasi nuo to momento, kai bandomoji medžiaga buvo įdėta pirmą kartą, iki tol, kol šalinimas pasiekia lygiagrečiąją kreivės dalį (palyginti pastovią vertę). Šis laikotarpio trukmė turi būti ne didesnė kaip šešios savaitės.

Vertinimo laikotarpis trunka tris savaites, trys savaites nuo to laiko, kai bandomosios medžiagos šalinimas pasiekia palyginti pastovią ir, paprastai didelę, vertę. Toms medžiagoms, kurių skaidymas per pirmąsias šešias savaites yra mažas ar visai nevyksta, vertinimo laikotarpiu laikomos dar trys savaitės.

Iš pradžių vienam bandymui skirtą įrenginį (-ius) užpildykite sėjimo kultūra, sumaišyta su intaku.

Tuomet įjungiamas aeratorius (ir aeroliftinis siurblys E OECD patvirtinamojo bandymo įrenginių atveju) bei dozavimo įtaisas (B).

Intako be bandomosios medžiagos srautas per aeravimo indą C turi būti arba litras per valandą ar pusė litro per valandą; taip vidutinė sulaikymo trukmė bus lygi trims arba šešioms valandoms.

Aeravimo intensyvumas turi būti reguliuojamas taip, kad indo C turinys būtų visą laiką suspenduotas, o ištirpusio deguonies kiekis būtų bent 2 mg/litre.

Atitinkamomis priemonėmis būtina išvengti putojimo. Neturi būti naudojami priešpučiai, kurie inhibuotų aktyvųjį dumblą.

Dumblas, kuris kaupiasi aeravimo indo C viršuje, (OECD patvirtinamojo bandymo įrenginių atveju ir nusodintuvo D apačioje bei cirkuliacijos sistemoje), turi būti grąžinamas į maišomą skystį ne mažiau kaip kartą per parą, nuvalant šepečiu arba kokiu nors kitu tinkamu būdu.

Jei dumblas nenusėda, nusodinimą galima paskatinti pridedant, jei reikia – ir pakartotinai, 2 ml 5 % geležies (III) chlorido tirpalo.

Nuotekos nuo 20 iki 24 valandų leidžiamos į rinktuvą (E ar F), tuomet, mišinį sumaišius, paimamas bandinys. Po to rinktuvas (E ar F) turi būti kruopščiai išplautas.

Proceso veiksmingumui tikrinti, bent du kartus per savaitę sukaupto ištakio filtrate matuojamas cheminis deguonies poreikis (COD) ar ištirpusi organinė anglis (DOC), tai daroma ir intako filtrate (naudojama membrana, kurios akučių dydis 0,45 μm, pirmieji 20 ml (maždaug) filtrato pilami lauk).

COD ar DOC mažėjimas turi išsilyginti, kai gaunamas maždaug tolygios paros skaidymo vertės.

Sausos medžiagos kiekis aeravimo indo aktyviajame dumble turi būti nustatomas du kartus per savaitę (g/litre). Įrenginius galima eksploatuoti vienu iš dviejų būdų: sausos medžiagos kiekis aktyviajame dumble turi būti nustatomas du kartus per savaitę, ir, jei jis didesnis kaip 2,5 g/litre, perteklinis aktyvusis dumblas turi būti pašalintas, arba iš kiekvieno indo kasdieną išpilama lauk 500 ml nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinio, kad vidutinė dumblo sulaikymo trukmė būtų šešios paros.

Kai išmatuoti ir įvertinti dviejų įrenginių parametrai [(proceso veiksmingumas (COD ar DOC šalinimas), dumblo koncentracija, dumblo nusodinamumas, ištakių drumstumas ir t. t.] tampa gana stabilūs, į vieno iš įrenginių intaką galima dėti bandomosios medžiagos pagal 1.6.2.2.

Kitu būdu bandomąją medžiagą galima dėti dumblo augimo laikotarpio pradžioje (1.6.2.1), ypač, kai dumblas yra dedamas kaip sėjimo kultūra.

1.6.2.2. Bandymų eiga

Palaikomos įdirbimo laikotarpio darbinės sąlygos ir į bandymo įrenginio intaką dedamas pakankamas kiekis bandomosios medžiagos pradinio tirpalo (maždaug 1 %), kad nuotekose būtų norima bandomosios medžiagos koncentracija (maždaug nuo 10 iki 20 mg/litre DOC ar 40 mg/litre COD). Tai galima padaryti maišant pradinį tirpalą į nuotekas kasdieną ar naudojant atskirą pumpavimo įrenginį. Šią koncentraciją galima pasiekti laipsniškai. Jei bandomosios medžiagos toksiško poveikio aktyviajam dumblui nenustatyta, galima bandyti didesnes koncentracijas.

Į tuščiojo bandymo įrenginį tiekiamas tik intakas, nededant medžiagos. Analizei imami atitinkamo tūrio bandiniai, kurie filtruojami per membraninį filtrą (0,45 μm), pirmuosius 20 ml (maždaug) filtrato pilant lauk.

Filtruoti bandiniai turi būti analizuojami tą pačią dieną, priešingu atveju jie turi būti konservuojami kokiu nors tinkamu būdu, pvz., 10 ml filtrato įpilti 0,05 ml 1 % gyvsidabrio (II) chlorido ($HgCl_2$) tirpalo ar laikyti bandinius 2 - 4 °C temperatūroje, jei laikomai ne ilgiau kaip 24 valandas, ar mažesnėje nei -18 °C temperatūroje, jei ilgesnį laiką.

Įdirbimo laikas, pridedant bandomosios medžiagos, neturi užtrukti ilgiau kaip šešias savaites, o įvertinimo laikotarpis neturi būti trumpesnis kaip trys savaitės, t.y. galutiniam rezultatui skaičiuoti reikia turėti maždaug nuo 14 iki 20 nustatymų.

Sudvejintu įrenginių režimas

Įrenginių sudvejinimas daromas, kartą per dieną 1,5 litro nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinio (įskaitant dumblą) iš aktyviojo dumblo aeravimo indų perpilant iš vieno į kitą. Jei bandomosios medžiagos yra labai absorbuojamos, iš nusodintuvų siurbiama po 1,5 litro skysčio virš dumblo ir supilama į kito įrenginio aktyviojo dumblo indą.

1.6.2.3. Analizė

Norint sekti medžiagos elgesį, galima daryti dviejų rūšių analizę:

DOC ir COD

DOC koncentracijų nustatymas anglies analizatoriumi daromas po du kartus, ir (ar) COD vertės nustatomos pagal (2) nuorodą.

Specifinė analizė

Bandomosios medžiagos koncentracija nustatoma atitinkamu analizės metodu. Tais atvejais, kai tai įmanoma, turi būti daroma ant dumblo adsorbuotos medžiagos specifinė analizė.

2. DUOMENYS IR ĮVERTINIMAS

2.1. Sudvejintų įrenginių režimas

Naudojant „sudvejintų įrenginių režimą“, kasdienis šalinimo laipsnis, DR skaičiuojamas pagal 1.2.1.

Šioms kasdienio šalinimo laipsnių DR vertėms daroma pataisa dėl medžiagos pernešimo persėjimo (trans-inokuliavimo) procese, į DRc vertes, taikant [2] lygtį trijų valandų ar [3] lygtį šešių valandų vidutinei sulaikymo trukmei.

$$DRc = \frac{8}{7}\ DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3}\ DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Skaičiuojama DRc verčių sekos vidutinė vertė ir papildomai pagal [4] lygtį skaičiuojamas standartinis nuokrypis:

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DRc_i\right)^2}{n - 1}} \quad [4]$$

čia:

s_{DRc} = DRc verčių sekos standartinis nuokrypis,

$D\overline{R}$ = DRc vidutinė vertė,

n = nustatymų skaičius.

DRc sekos išskirtys (outliers) eliminuojamos, naudojant atitinkamą statistinę metodiką, pvz., Nalimov (6), 95 % pasikliovimo lygmeniui, ir DRc rinkinio be išskirčių vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis skaičiuojami iš naujo.

Galutinis rezultatas skaičiuojamas pagal lygtį [5] kaip

$$DRc = D\overline{R} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}}\ s_{DRc} \quad [5]$$

čia:

$t_{n-1};\alpha$ = iš lentelės paimta t vertė n skaičiui E ir E_0 verčių porų ir statistinis pasikliovimo lygmuo P (P = 1 - α), kai P užduotas 95 % (1).

Rezultatas pateikiamas, nurodant vidutinę vertę su nuokrypio ribomis 95 % pasikliovimo lygmeniui, atitinkamą standartinį nuokrypį, DRc duomenų skaičių rinkinyje, atmetus išskirtis, ir išskirčių skaičių, pvz.:

DRc = 98,6 ± 2,3 % DOC šalinimas,

s = 4,65 % DOC šalinimas,

n = 18,

x = išskirčių skaičius.

2.2. **Nesuporuotų įrenginių režimas**

Įrenginių veikimas gali būti patikrintas tokiu būdu:

$$\text{COD ar DOC šalinimo procentinė vertė} = \frac{\text{nuotekų COD ar DOC} - \text{ištakio COD ar DOC}}{\text{nuotekų COD ar DOC}} \times 100$$

Šios kasdienio šalinimo vertės gali būti atidėtos grafiškai, kad būtų galima atskleisti bet kokias tendencijas, pvz, aklimatizavimo.

2.2.1. *Naudojant COD/DOC nustatymus*

Kasdienis šalinimo laipsnis DR yra skaičiuojamas pagal 1.2.1.

Skaičiuojama DR verčių sekos vidutinė vertė; papildomai skaičiuojamas standartinis nuokrypis pagal:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DR_i\right)^2}{n - 1}} \quad [6]$$

čia:

s_{DR} = DR_i verčių sekos standartinis nuokrypis,

$D\overline{R}$ = DR_i vidutinė vertė,

n = nustatymų skaičius.

DR sekos išskirtys eliminuojamos, naudojant atitinkamą statistinę metodiką, pvz., Nalimov (6), 95 % pasikliovimo lygmeniui, ir iš naujo skaičiuojami DR rinkinio be išskirties vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis.

Tuomet galutinis rezultatas skaičiuojamas pagal lygtį [7] kaip

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR} \quad [7]$$

čia:

$t_{n-1};\alpha$ = iš lentelės paimta t vertė n skaičiui E ir E_O verčių porų ir statistinis pasikliovimo lygmuo P (P = 1 - α), kai P užduotas 95 % (1).

Rezultatas pateikiamas, nurodant vidutinę vertę su nuokrypio ribomis 95 % pasikliovimo lygmeniui, atitinkamą standartinį nuokrypį, DR duomenų skaičių rinkinyje, atmetus išskirtis, ir išskirčių skaičių, pvz.:

DR = (98,6 ± 2,3) % DOC šalinimo,

s = 4,65 % DOC šalinimo,

n = 18,

x = išskirčių skaičius.

2.2.2. *Naudojant specifinę analizę*

Bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės fazės procentinė vertė (R_W) yra skaičiuojama pagal 1.2.2.

3. ATASKAITA

3.1. Bandymų ataskaita

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— 3 papildyme pateiktas blankas, kuriame nurodytos eksploatavimo sąlygos,

— pasirinktasis aparatas (OECD patvirtinamojo bandymo ar akytasis indas),

— pasirinktas eksploatavimo režimas: sudvejintų įrenginių ar ne,

— nuotekos: sintetinės ar buitinės – buitinių nuotekų atveju nurodyti bandinio vietą ir ėmimo datą,

— sėjimo kultūra, su bandinio ėmimo vieta ir data,

— trumpas išdėstymas su analizės metodo aprašymu, jei buvo daroma specifinė analizė,

— COD ar DOC šalinimo kitimo laike grafikas, įskaitant įdirbimo ir įvertinimo laikotarpius,

— bandomosios medžiagos pradiniame tirpale analizinis išgavimas COD ar DOC pavidalu,

— jei buvo darytos specifinės analizės, bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės terpės procentinės vertės kitimo laike grafikas (įdirbimo ir įvertinimo laikotarpis),

— bandomosios medžiagos DOC ar COD šalinimo vidutinė vertė ir standartinis nuokrypis, skaičiuoti pagal įvertinimo laikotarpio rezultatus, t. y. kai vyksta pastovus bandomosios medžiagos šalinimas ar stabilaus veikimo laikotarpiu,

— aktyviojo dumblo koncentracijos kitimo laike grafikas,

— visos pastabos apie aktyvųjį dumblą (perteklinio dumblo šalinimas, tūrio didėjimas, $FeCl_3$, ir t. t.),

— bandyme naudota bandomosios medžiagos koncentracija,

— visi rezultatai apie dumblo analizę,

— visa informacija ir eksperimentiniai rezultatai, susiję su bandomąja medžiaga ir etalonine medžiaga, jei ji buvo naudota,

— mokslinis bet kokių bandymų metodikos keitimų pagrindimas.

3.2. **Duomenų interpretavimas**

Mažų bandomosios medžiagos šalinimo iš vandeninės terpės verčių priežastimi gali būti mikroorganizmų inhibavimas bandomąja medžiaga. Tai dar galima nustatyti pagal dumblo irimą ir jo kiekio mažėjimą, dėl ko skystis virš dumblo pasidaro drumstas, ir pagal bandomojo įrenginio COD (ar DOC) šalinimo našumo mažėjimą.

Kartais įtakos gali turėti fizikocheminė adsorbcija. Skirtumai tarp biologinio poveikio molekulei ir fizikocheminės adsorbcijos gali būti nustatyti, darant dumblo analizę po atitinkamos desorbcijos.

Reikia toliau bandyti, jei reikia nubrėžti skirtumą tarp biologinio skaidymo (ar dalinio biologinio skaidymo) ir adsorbcijos.

Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) sėjimo kultūra naudoti skystį virš dumblo.

Jei stebimos didelės DOC ar COD šalinimo vertės, to priežastis yra biologinis skaidymas, tuo tarpu, jei šalinimo vertės mažos, biologinis skaidymas neatskiriamas nuo eliminavimo. Pvz., jei tirpus junginys turi didelę 98 % adsorbcijos konstantą, o perteklinio dumblo nuostolių laipsnis yra 10 % per parą, eliminavimas gali būti iki 40 %; jei perteklinio dumblo nuostolių laipsnis yra 30 %, eliminavimas dėl adsorbcijos ant perteklinio dumblo ir pašalinimo kartu su juo gali sudaryti iki 65 % (4).

Taikant specifinę analizę, reikia kreipti dėmesį į ryšį tarp medžiagos sandaros ir taikomos specifinės analizės. Šiuo atveju stebimas reiškinys negali būti interpretuojamas kaip junginio mineralizacija.

4. **NUORODOS**

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A,* Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Annex V C9 Degradation Test – Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, *Official Journal of the European Communities,* No L 251, 19. 9. 1984.

3. Painter, H. A., King, E. F., WRC *Porous-Pot method for assessing biodegradability,* Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.

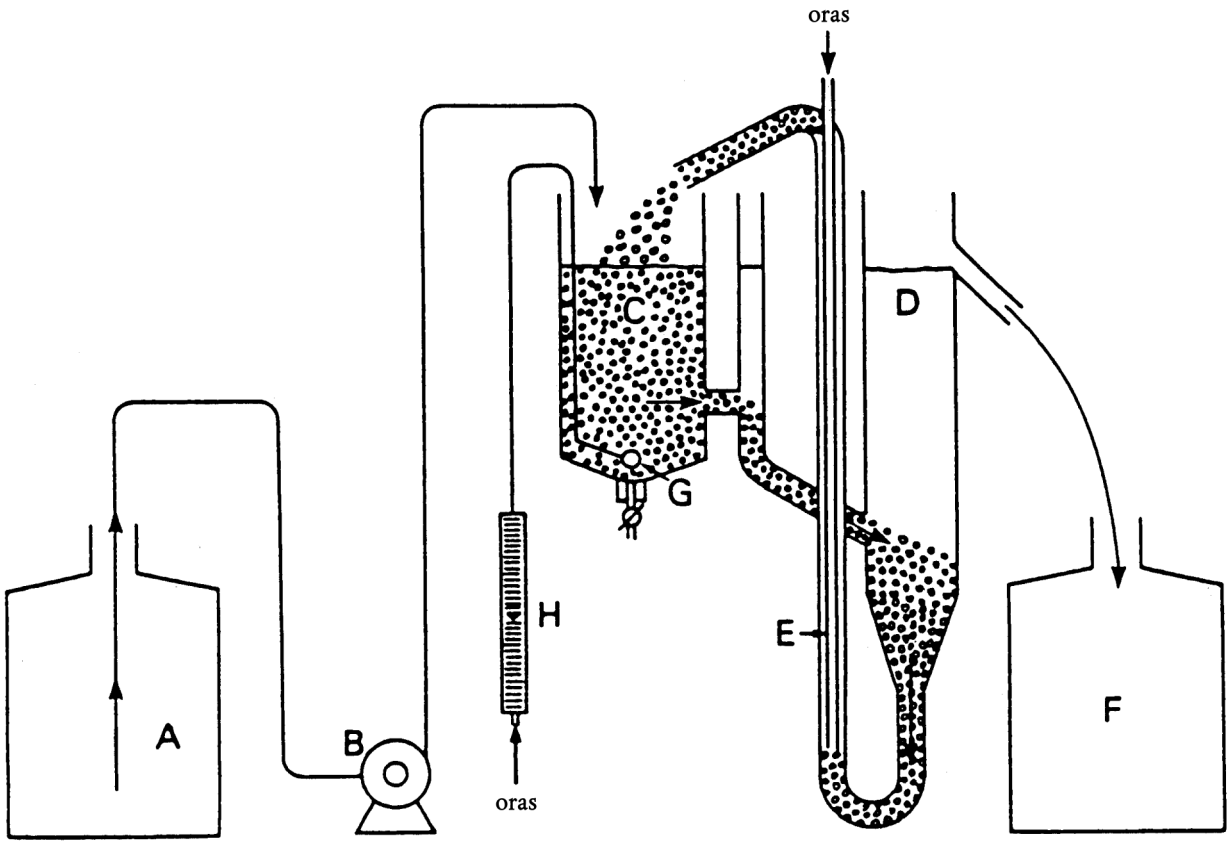
4. Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161 to 171.

5. Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, *Official Journal of the European Communities,* No L 109, 22.4.1982, amending Council Directives 73/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, *Official Journal of the European Communities,* No L 347, 17.12.1973.

6. Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißetests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmetoden, *Fresenius-Zeitschrift fur Analytiche Chemie,* 303 (1980), pp. 406 to 408.

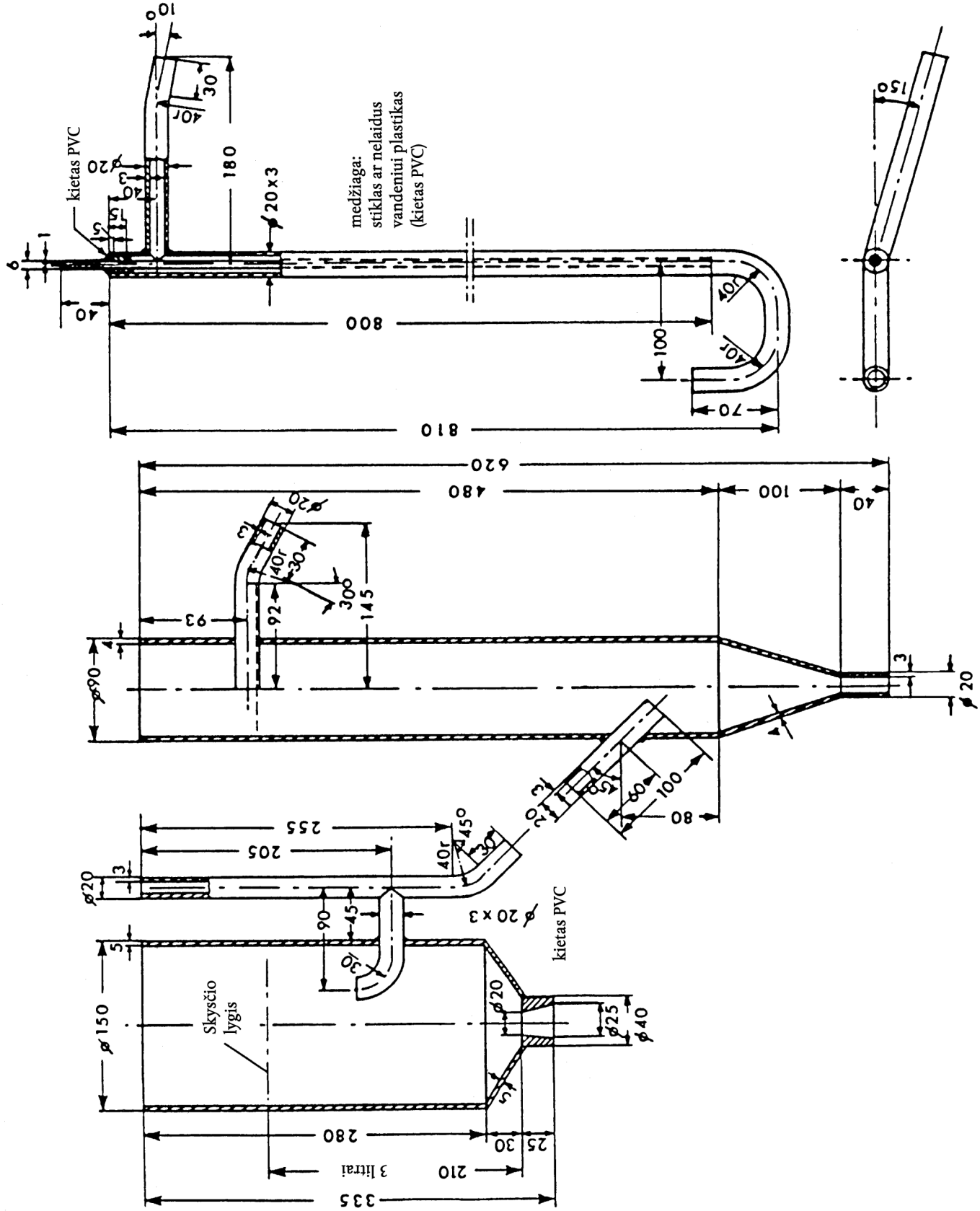
1 Priedėlis

1 paveikslas



Detalizavimas: A: indas nuotekoms laikyti;
B: dozavimo įtaisas;
C: aeravimo kamera (3 l talpos);
D: nusodintuvas;
E: aeroliftinis siurblys;
F: rinktuvas;
G: aeratorius;
H: oro debitmatis (neprivalomas).

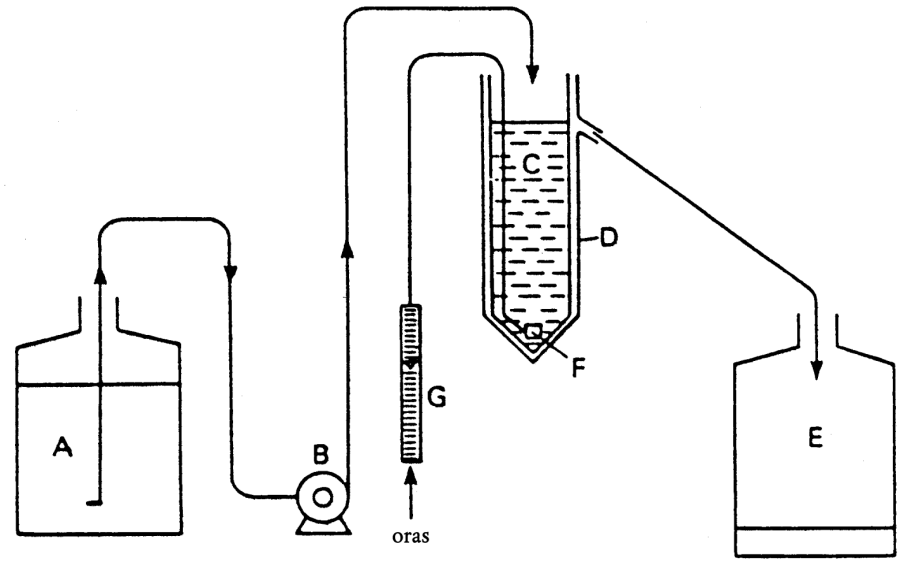
2 paveikslas



2 Priedėlis

1 paveikslas

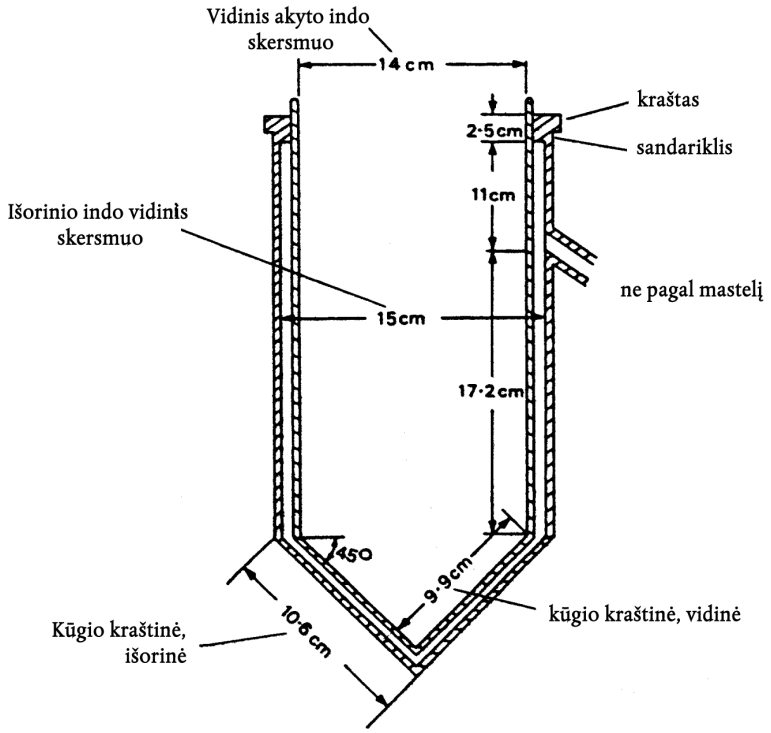
Įranga, naudota įvertinti biologinį skaidymą



Detalizavimas: A: indas nuotekoms laikyti;
B: dozavimo siurblys;
C: akytas aeravimo indas;
D: išorinis indas su nelaidžiomis sienelėmis;
E: ištakio rinktuvas;
F: difuzinis aeratorius;
G: rotametras (neprivalomas).

2 paveikslas

Trijų litrų talpos akyto indo tipo aeratoriaus detalės



3 Priedėlis

Sąlygos vykdyti aktyviojo dumblo modeliavimo bandymą

Žymėti kiekvienoje grupėje

Aparatūra

OECD patvirtinamasis bandymas ☐
Akytojo indo bandymas ☐

Eksploatavimo režimas

Atskiras įrenginys ☐
Sudvejinti įrenginiai ☐
Nesudvejinti įrenginiai ☐

Persėjimas

Netaikomas ☐
Aktyviojo dumblo ☐
Skysčio virš dumblo ☐

Vidutinė sulaikymo trukmė

Trys valandos ☐
Šešios valandos ☐

Pagrindinė mitybinė terpė

Buitinės nuotekos ☐
Sintetinės nuotekos ☐

Sėjimo kultūra

Antrinis ištakis ☐
Sudėtinė ☐
Aktyvusis dumblas ☐

Bandomosios medžiagos dėjimas

Bandymo pradžioje ☐
Laipsniškai didinant kiekį ☐
Dumblui susidarius ☐

Analizė

Specifinė ☐
COD ☐
DOC ☐

BIOLOGINIS SKAIDYMAS

AKTYVIOJO DUMBLO KVĖPAVIMO INHIBAVIMO BANDYMAS

1. **METODAS**

1.1. **Įvadas**

Aprašytas metodas įvertina bandomosios medžiagos poveikį mikroorganizmams, kai apibrėžtomis sąlygomis ir naudojant skirtingas bandomosios medžiagos koncentracijas matuojamas kvėpavimo intensyvumas.

Šio metodo tikslas yra duoti greitą atrankos metodą, kuriuo galima būtų identifikuoti medžiagas, galinčias neigiamai veikti aerobinius mikrobinio valymo įrenginius, ir nustatyti bandomųjų medžiagų koncentracijas, kurias naudojant nebūtų inhibavimo ir kurios būtų tinkamos naudoti biologinio skaidymo bandymuose.

Prieš galutinį bandymą gali būti daromas intervalo nustatymo bandymas. Jis suteikia informacijos apie koncentracijų, kurias reikia naudoti pagrindiniame bandyme, intervalą.

Į bandymo schemą įtraukti du kontroliniai bandymai be bandomosios medžiagos, vienas daromas bandymų serijos pradžioje, o kitas – pabaigoje. Be to,, kiekviena aktyviojo dumblo partija turi būti patikrinta, naudojant etaloninę medžiagą.

Šį metodą lengviausia taikyti medžiagoms, kurios dėl jų tirpumo vandenyje ir mažo lakumo greičiausiai lieka vandenyje.

Medžiagoms,kurių tirpumas bandomojoje terpėje yra ribotas, gali būti neįmanoma nustatyti EC_{50}.

Išvados, padarytos pagal rezultatus, kurie remiasi deguonies suvartojimu, gali būti klaidingos, kai bandomoji medžiaga turi polinkį atskirti oksidavimą ir fosforilinimą oksidacinio fosforilinimo procese.

Norint daryti bandymą, naudinga turėti tokia informaciją:

— tirpumas vandenyje,

— garų slėgis,

— struktūrinė formulė,

— bandomosios medžiagos grynumas.

Patarimas

Aktyviajame dumble gali būti potencialiai patogeninių organizmų, todėl elgtis su juo reikia atsargiai.

1.2. **Apibrėžimai ir vienetai**

Kvėpavimo intensyvumas yra deguonies suvartojimas nuotekų aerobiniame dumble esančiais mikroorganizmais, paprastai reiškiamas mg O_2 vienam mg dumblo per valandą.

Norint skaičiuoti konkrečios koncentracijos bandomosios medžiagos inhibuojamąjį veikimą, kvėpavimo intensyvumas reiškiamas dviejų kontrolinių kvėpavimo intensyvumo verčių vidurkio procentine dalimi:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{inhibavimo procentinė vertė}$$

čia:

R_s = deguonies suvartojimo intensyvumas, bandant konkrečią bandomosios medžiagos koncentraciją,

R_{C1} = deguonies suvartojimo intensyvumas 1 kontroliniame bandyme,

R_{C1} = deguonies suvartojimo intensyvumas 2 kontroliniame bandyme.

EC_{50} šiame metode yra bandomosios medžiagos koncentracija, kurią naudojant kvėpavimo intensyvumas sudaro 50 % kvėpavimo intensyvumo kontroliniame kvėpavimo bandyme šiame metode aprašytomis sąlygomis.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Rekomenduojama etalonine medžiaga naudoti 3,5-dichlorfenolį, kuris yra žinomas kvėpavimo inhibitorius, ir naudoti jį kaip priemonę patikrinti, ar dumblo jautrumas nėra nenormalus, nustatant medžiagos EC_{50} kiekvienai aktyviojo dumblo partijai.

1.4. **Bandymų metodo esmė**

Aktyvusis dumblas maitinamas standartiniame kiekyje mitybinės terpės, kurią sudaro sintetinės nuotekos, ir po 30 min ar 3 valandų sąlyčio, arba abiem atvejais, matuojamas dumblo kvėpavimo intensyvumas. Be to,, dar matuojamas to paties aktyviojo dumblo kvėpavimo intensyvumas, dedant įvairios koncentracijos bandomosios medžiagos, kai kitos sąlygos yra identiškos. Bandomosios medžiagos inhibuojamasis veikimas konkrečiai koncentracijai išreiškiamas dvejuose kontroliniuose bandymuose gautų verčių vidurkio procentine dalimi. Pagal matavimus skirtingose koncentracijose apskaičiuojama EC_{50} vertė.

1.5. **Kokybės kriterijai**

Bandymo rezultatai tinkami, jei:

— kvėpavimo intensyvumo vertės abiejuose kontroliniuose bandymuose skiriasi mažiau kaip 15 %,

— 3,5-dichlorfenolio EC_{50} (30 minučių ir (ar) trijų valandų) yra priimtiname intervale nuo 5 mg/litre iki 30 mg/litre.

1.6. **Bandymų metodo aprašymas**

1.6.1. *Reagentai*

1.6.1.1. Bandomosios medžiagos tirpalai

Bandomosios medžiagos tirpalai ruošiami iš pradinio tirpalo prieš pat tyrimo pradžią. Jei daroma pagal toliau aprašytą rekomenduojamą metodiką, tinka 0,5 g/litre koncentracijos pradinis tirpalas.

1.6.1.2. Etaloninės medžiagos tirpalas

3,5-dichlorfenolio tirpalą galima ruošti, pavyzdžiui taip: tirpinkite 0,5 g 3,5-dichlorfenolio 10 ml 1 M NaOH, skieskite distiliuotu vandeniu maždaug iki 30 ml, pilkite maišydami 0,5 M H_2SO_4, kol pradeda kristi nuosėdos, tam maždaug reikia 8 ml 0,5 M H_2SO_4, ir galiausiai distiliuotu vandeniu skieskite mišinį iki vieno litro. pH vertė turi būti intervale nuo 7 iki 8.

1.6.1.3. Sintetinės nuotekos

Sintetinių nuotekų mitybinė terpė ruošiama tirpinant tokius šių medžiagų kiekius 1 litre vandens:

— 16 g peptono,

— 11 g mėsos ekstrakto,

— 3 g karbamido,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2 \times 2\ H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4 \times 7\ H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

1 pastaba. Šios sintetinės nuotekos yra koncentratas, kurio koncentracija 100 kartų didesnė, nei nuotekų, aprašytų OECD techninėje ataskaitoje „Proposed metod for the determination of the biodegradability of surfactants used in synthetic detergents“ (Siūlomas paviršinio aktyvumo medžiagų, naudojamų sintetiniuose plovikliuose, biologinio skaidomumo nustatymo metodas) (1976 m. birželio 11 d.), ir pridedant kalio hidrofosfato.

2 pastaba. Jei paruošta terpė naudojama ne iš karto, ji turi būti laikoma tamsoje nuo 0 iki 4 °C ir ne ilgiau, kaip vieną savaitę sąlygomis, kurios nekeistų nuotekų sudėties. Prieš dedant saugoti, terpę galima sterilizuoti, arba peptonas ir mėsos ekstraktas dedami prieš pat bandymo pradžią. Prieš naudojant, terpė turi būti gerai sumaišoma ir nustatoma jos pH vertė.

1.6.2. *Aparatūra*

Matavimo aparatas: Tiksli konstrukcija nėra svarbi. Tačiau kolboje turi likti neužimtos erdvės, o zondas turi sandariai uždaryti matavimo kolbą.

Be įprastos laboratorijos įrangos dar reikalinga tokia speciali įranga:

— matavimo aparatas,

— aeravimo įtaisas,

— pH-elektrodas ir pH matavimo įranga,

— O_2 elektrodas.

1.6.3. *Sėjimo kultūros ruošimas*

Bandymuose mikrobine sėjimo kultūra naudojamas aktyvusis dumblas iš valymo įrenginio, valančio daugiausia buitines nuotekas.

Jei būtina, grįžus į laboratoriją stambias daleles galima pašalinti, paliekant dumblą trumpą laiką, pvz., 15 minučių, nusistoti, ir viršutinį smulkesnių dalelių sluoksnį dekantuoti ir toliau naudoti. Kitu būdu dumblą galima sumaišyti, kelioms sekundėms įjungus maišytuvą.

Be to,, jei manoma, kad gali būti inhibuojančių medžiagų, dumblas turi būti išplautas vandentiekio vandeniu ar izotoniniu tirpalu. Po centrifugavimo skystis nuo nuosėdų dekantuojamas (plaunama tris kartus).

Nedidelis dumblo kiekis sveriamas ir džiovinamas. Remiantis šiuo rezultatu galima apskaičiuoti, kiek šlapio dumblo reikia suspenduoti vandenyje, kad gautame aktyviojo dumblo ir vandens mišinyje suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija būtų nuo 2 g/litre iki 4 g/litre. Toks kiekis atitinka koncentraciją bandomojoje terpėje nuo 0,8 iki 1,6 g/litre, jei būtų taikoma toliau rekomenduota metodika.

Jei nėra galimybės dumblą panaudoti rinkimo dieną, vienam litrui aktyviojo dumblo įpilama 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės, paruoštos, kaip aprašyta aukščiau; ir mišinys per naktį aeruojamas 20 ± 2 °C temperatūroje. Dieną jis ir toliau aeruojamas, kol bus panaudotas. Prieš naudojant dumblą, tikrinama pH vertė ir prireikus nustatoma intervale nuo 6 iki 8. Suspenduotų kietųjų dalelių koncentracija aktyviojo dumblo ir nuotekų mišinio bandinyje turi būti nustatyta, kaip tai aprašyta ankstesnėje pastraipoje.

Jei ta pati dumblo partija turi būti naudojama kitomis dienomis (ne ilgiau kaip keturios paros), kiekvienos darbo dienos pabaigoje vienam litrui dumblo įpilama dar 50 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės.

1.6.4. *Bandymo eiga*

Trukmė/sąlyčio trukmė:	30 minučių ir (arba) trys valandos aeravimo sąlygomis
Vanduo:	Geriamasis vanduo (prireikus dechloruotas)
Oro tiekimas:	Švarus, be alyvos oras. Oro srautas nuo 0,5 iki 1 l/min
Matavimo aparatūra:	Plokščiadugnė kolba, pvz., BOD kolba
Deguonies matuoklis:	Tinkamas deguonies elektrodas ir registravimo įrenginys
Mitybinis tirpalas:	Sintetinės nuotekos (žr. aukščiau)
Bandomoji medžiaga:	Bandomosios medžiagos tirpalas ruošiamas iš naujo bandymo pradžioje
Etaloninė medžiaga:	pvz., 3,5-dichlorfenolis (bent trijų koncentracijų)
Kontroliniai bandymai:	Sėjimo kultūros bandinys be bandomosios medžiagos
Temperatūra:	20 ± 2 °C.

Toliau pateikiama siūloma eksperimento metodika, kurią galima taikyti ir bandomajai ir etaloninei medžiagai trijų valandų sąlyčio trukmės atvejui:

Naudojami keli indai (pvz., vieno trijų litrų talpos laboratorinės stiklinės).

Turi būti naudojamos bent penkios koncentracijos, besiskiriančios pastoviu santykiu, geriausiai ne didesniu kaip 3,2.

Laiku „0“ 16 ml sintetinių nuotekų mitybinės terpės vandeniu skiedžiama iki 300 ml. Įpilama 200 ml mikrobinės sėjimo kultūros ir visas mišinys (500 ml) supilamas į pirmąjį indą (pirmasis kontrolinis bandinys C_1).

Bandymų indai turi būti visą laiką aeruojami tiek, kad ištirpusio O_2 kiekis būtų ne mažesnis kaip 2,5 mg/litre ir kad prieš pat kvėpavimo intensyvumo matavimą O_2 koncentracija būtų apie 6,5 mg/litre.

Laiku „15 minučių“ (15 minučių trukmė yra laisvai pasirenkama, tačiau tai patogus laiko tarpas) kartojama, kas padaryta anksčiau, tik prieš tai, kaip skiesti vandeniu iki 300 ml ir pilti mikrobinės sėjimo kultūros iki 500 ml, į 16 ml sintetinių nuotekų įpilama 100 ml pradinio bandomosios medžiagos tirpalo. Šis mišinys supilamas į antrą indą ir aeruojamas, kaip nurodyta aukščiau. Kas 15 minučių veiksmų seka kartojama, imant skirtingus bandomosios medžiagos pradinio tirpalo tūrius, kad būtų gauta eilė indų su skirtingomis bandomosios medžiagos koncentracijomis. Paskutiniuoju ruošiamas antrasis kontrolinis bandinys (C_2).

Po trijų valandų fiksuojama pH vertė, ir gerai sumaišytas pirmojo indo turinio bandinys supilamas į matavimo aparatą, kuriuo ne ilgiau kaip 10 minučių matuojamas kvėpavimo intensyvumas.

Šis nustatymas kas 15 minučių kartojamas su kiekvieno indo turiniu tokiu būdu, kad sąlyčio trukmė visuose induose būtų trys valandos.

Tokiu pat būdu su kiekviena mikrobinės sėjimo terpės partija bandoma etaloninė medžiaga.

Jei reikia matuoti 30 min sąlyčio sąlygomis, būtina taikyti kitokį matavimo režimą (pvz., turėti daugiau nei vieną deguonies matuoklį).

Jei reikia nustatyti cheminį deguonies suvartojimą, ruošiami papildomi indai su bandomąja medžiaga, sintetinių nuotekų mitybine terpe ir vandeniu, bet be aktyviojo dumblo. Deguonies suvartojimas matuojamas ir užrašomas po 30 minučių ir (ar) trijų valandų aeravimo (sąlyčio trukmė).

2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Kvėpavimo intensyvumas skaičiuojamas pagal savirašio užrašą apytikriai tarp 6,5 mg/litre O_2 ir 2,5 mg/litre O_2, ar 10 minučių tuo laikotarpiu, kai kvėpavimo intensyvumas yra mažas. Kvėpavimo kreivės dalis, kurioje matuojamas kvėpavimo intensyvumas, turi būti tiesiška.

Jei kvėpavimo intensyvumas dvejuose kontroliniuose bandiniuose vienas nuo kito skiriasi daugiau kaip 15 %, ar etaloninės medžiagos EC_{50} (30 minučių ir (ar) trijų valandų) nėra priimtiname intervale (nuo 5 iki 30 mg/litre 3,5-dichlorfenoliui), bandymas yra nevalidus ir turi būti pakartotas.

Inhibavimo procentinė vertė skaičiuojama kiekvienai bandomajai koncentracijai (žr. 1.2). Procentinės inhibavimo vertės priklausomybė nuo koncentracijos brėžiama logaritminiame-normaliame (ar logaritminiame-tikimybiniame) popieriuje, ir gaunama EC_{50} vertė.

95 % pasikliovimo rėžiai EC_{50} vertėms gali būti nustatyti, taikant standartines metodikas.

3. ATASKAITA

3.1. Bandymų ataskaita

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— bandomoji medžiaga: cheminio identifikavimo duomenys,

— bandymų sistema: aktyviojo dumblo šaltinis, koncentracija ir bet koks pradinis kondicionavimas,

— bandymų sąlygos:

  — reakcijos mišinio pH vertė prieš kvėpavimo intensyvumo matavimą,

  — bandymų temperatūra,

  — bandymų trukmė,

  — etaloninė medžiaga ir jos išmatuota EC_{50} vertė,

  — abiotinis deguonies suvartojimas (jei tai vyko),

— rezultatai:

  — visi matavimuose gauti duomenys,

  — inhibavimo kreivė ir metodas EC_{50} skaičiuoti,

  — EC_{50} ir, jei įmanoma, 95 % pasikliovimo rėžiai, EC_{20} ir EC_{80},

  — visi pastebėjimai ir bet kokie nukrypimai nuo šio bandymo metodo, kurie galėtų turėti įtakos rezultatui.

3.2. Duomenų interpretavimas

Į EC_{50} vertę turi būti žiūrima tiktai kaip į orientacinį bandomosios medžiagos toksiškumą nuotekų valymo aktyviuoju dumblu procesui ar nuotekų mikroorganizmams, kadangi aplinkos sudėtingų sąveikų laboratoriniame bandyme negalima tiksliai modeliuoti. Be to„ bandomosios medžiagos, kurios gali inhibuoti amoniako oksidavimą, taip pat gali duoti atipiškas inhibavimo kreives. Taigi šios kreivės turi būti interpretuojamos atsargiai.

4. **NUORODOS**

1. International Standard ISO 8192-1986.

2. Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.

3. Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer. L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.

4. ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103,* dar aprašyti:

5. Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.

6. Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.

7. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209,* Decision of the Council C(81) 30 final.

BIOLOGINIS SKAIDYMAS

MODIFIKUOTAS SCAS BANDYMAS

1. METODAS

1.1. Įvadas

Metodo tikslas yra įvertinti vandenyje tirpių, nelakių organinių medžiagų galimą biologinį suskaidymą, kai jas ilgą laiką veikia palyginti didelės koncentracijos mikroorganizmai. Mikroorganizmų gyvybingumas tuo laikotarpiu palaikomas kasdien pridedant nusistojusių nuotekų mitybinės terpės. (Savaitgaliais nuotekas galima laikyti 4 °C temperatūroje. Dar galima naudoti sintetines nuotekas, kurios naudojamos OECD patvirtinamajame bandyme).

Ant suspenduotų kietųjų dalelių gali vykti fizikocheminė adsorbcija, todėl į tai turi būti atsižvelgta interpretuojant rezultatus (žr. 3.2).

Dėl skystosios fazės didelės sulaikymo trukmės (36 valandos), ir dėl nutrūkstamo mitybinių medžiagų pridėjimo, bandymas nemodeliuoja nuotekų valymo įrenginio sąlygų. Rezultatai, gauti įvairioms bandymų medžiagoms, rodo, kad bandymas turi didelį biologinio skaidymo potencialą.

Bandyme sudarytos sąlygos yra labai palankios atrankai ir (ar) adaptavimui mikroorganizmų, galinčių suskaidyti bandomąją medžiagą. (Metodika gali būti taikoma ruošti aklimatizuotas sėjimo kultūras kitiems bandymams).

Šiame bandyme bandomosios medžiagos biologiniam suskaidymui įvertinti naudojamas ištirpusios organinės anglies kiekio matavimas. Būtų geriau, jei DOC būtų nustatoma po parūgštinimo ir prapūtimo, nei kaip skirtumas $C_{bendroji}$ - $C_{neorganinė}$.

Jei lygiagrečiai taikyti specifinį analizės metodą, gali būti įmanoma įvertinti medžiagos pirminį biologinį skaidymą (pirminės cheminės sandaros išnykimas).

Metodas tinka tik toms organinėms bandomosioms medžiagoms, kurios bandyme naudojamos koncentracijos:

— tirpios vandenyje (bent 20 mg/litre ištirpusios organinės anglies),

— garų slėgis yra labai mažas,

— neinhibuoja bakterijų,

— bandymų sistemoje adsorbuojamos tik nežymiu laipsniu,

— iš bandomojo tirpalo nepradingsta dėl putojimo.

Turi būti nustatytas organinės anglies kiekis bandomoje medžiagoje.

Norint paaiškinti gautus rezultatus, ypač kai rezultatai yra maži arba nežymūs, naudinga būtų turėti informacijos apie bandomosios medžiagos pagrindinių komponentų santykinę dalį.

Kai reikia paaiškinti mažus rezultatus ir pasirinkti tinkamą bandomąją koncentraciją, pageidautina turėti informacijos apie medžiagos toksiškumą mikroorganizmams.

1.2. Apibrėžimai ir vienetai

C_T = bandomosios medžiagos koncentracija, skaičiuojama organinės anglies kiekiu, kuris yra nusistovėjusiose nuotekose ar pridedamas į jas aeravimo laikotarpio pradžioje (mg/litre),

C_t = ištirpusios organinės anglies koncentracija, nustatyta bandomajame skystyje virš nuosėdų aeravimo laikotarpio pabaigoje (mg/litre),

C_c = ištirpusios organinės anglies koncentracija, nustatyta kontrolinio bandinio skystyje virš nuosėdų aeravimo laikotarpio pabaigoje (mg/litre).

Šiame bandyme biologinis skaidymas nustatomas kaip organinės anglies išnykimas. Biologinį skaidymą galima išreikšti:

1. Kasdien įdedamos medžiagos šalinimo procentine verte D_{da}:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

čia D_{da} = skaidymas/kasdienis pridėjimas.

2. Kiekvienos dienos pradžioje turimo medžiagos kiekio šalinimo procentinė vertė D_{ssd}:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\,(i+1)} + 3C_{c\,(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2\ (a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2\ (b)]$$

čia D_{ssd} = skaidymas/medžiagos kiekis dienos pradžioje;

indeksai i ir (i + 1) nurodo matavimo dieną.

2(a) lygtį rekomenduojama taikyti, jei ištakio DOC kinta diena po dienos, o 2(b) lygtis gali būti taikoma, kai ištakio DOC diena po dienos palyginti nekinta.

1.3. **Etaloninės medžiagos**

Kai kuriais atvejais, kai tiriamos naujos medžiagos, etaloninės medžiagos gali būti naudingos, tačiau nėra specifinės etaloninės medžiagos, kurią galima būtų rekomenduoti šiam bandymui.

Visų pirma, yra pateikti duomenys apie kelis junginius, įvertintus tarplaboratorinio lyginimo bandymuose (žr. 1 papildymą), taigi retkarčiais galima metodą sutikrinti ir jo rezultatus lyginti su rezultatais, gautais kitais metodais.

1.4. **Bandymų metodo esmė**

Aktyvusis dumblas iš nuotekų valymo įrenginio dedamas į pusiau nepertraukiamo veikimo aktyviojo dumblo įrenginį [*Semi-Continuous Activated Sludge* (SCAS)]. Įdedama bandomosios medžiagos ir nusistojusių butinių nuotekų, ir mišinys aeruojamas 23 valandas. Paskui aeravimas stabdomas, dumblas paliekamas nusistoti ir skystis virš dumblo pašalinamas.

Aeravimo kameroje likęs dumblas maišomas su kita bandomosios medžiagos ir nuotekų dalimi ir ciklas kartojamas.

Biologinio skaidymo buvimas įrodomas, nustatant ištirpusios organinės anglies kiekį skystyje virš dumblo. Ši vertė lyginama su verte, gauta skysčiui kontroliniame mėgintuvėlyje, kuriame buvo tik nuotekos.

Kai taikomas specifinis analizės metodas, galima nustatyti pradinės medžiagos koncentracijos mažėjimą dėl jos molekulių biologinio skaidymo (pirminis biologinis skaidomumas).

1.5. **Kokybės kriterijai**

Šio metodo, kuris remiasi ištirpusios organinės medžiagos šalinimu, atkuriamumas dar nėra nustatytas. (Kai tiriamas pirminis biologinis skaidymas, labai tikslūs duomenis yra gauti medžiagoms, kurios skaidomos dideliu laipsniu).

Metodo jautrumą dideliu laipsniu lemia tuščiojo bandinio kintamumas ir, kiek mažiau, ištirpusios anglies nustatymo preciziškumas ir bandomosios medžiagos kiekis skystyje kiekvieno ciklo pradžioje.

1.6. **Bandymų eigos aprašymas**

1.6.1. *Paruošiamieji darbai*

Oro tiekimo vamzdeliai (1 paveikslas) jungiami prie reikiamo skaičiaus švarių aeravimo įrenginių, skirtų kiekvienai bandymo medžiagai ir kontroliniams bandiniams, arba galima naudoti originalųjį 1,5 litro SCAS bandymo įrenginį. Į įrenginius per medvilnės filtrą tiekiamame suslėgtame ore turi nebūti organinės anglies ir, garavimo nuostoliams mažinti, oras turi būti prisotintas vandens garų.

Aktyviojo dumblo ir nuotekų mišinio bandinys, kuriame būtų nuo 1 iki 4 g/litre suspenduotų kietųjų dalelių, gaunamas iš daugiausia buitines nuotekas valančio aktyviojo dumblo įrenginio. Kiekvienam aeravimo įrenginiui reikia maždaug 150 ml aktyviojo dumblo ir nuotekų mišinio.

Pradiniams bandomosios medžiagos tirpalams ruošti naudojamas distiliuotas vanduo; paprastai reikia, kad organinės anglies koncentracija būtų 400 mg/litre, tokiu atveju bandomosios medžiagos koncentracija kiekvieno aeravimo ciklo pradžioje, kai nevyksta biologinis skaidymas, yra 20 mg/litre.

Galima naudoti didesnes koncentracijas, jei tai įmanoma dėl medžiagos toksiškumo mikroorganizmams.

Nustatomas organinės anglies kiekis pradiniuose tirpaluose.

1.6.2. *Bandymų sąlygos*

Bandymas turi būti daromas 20–25 °C temperatūroje.

Naudojama didelė aerobinių mikroorganizmų koncentracija (nuo 1 iki 4 g/litre suspenduotų kietųjų dalelių), ir tikroji sulaikymo trukmė yra 36 valandos. Anglingoji medžiaga nuotekų mitybinėje terpėje oksiduojama dideliu laipsniu, paprastai tai įvyksta per aštuonias valandas nuo kiekvieno aeravimo ciklo pradžios. Po to, iki aeravimo laikotarpio pabaigos dumblas kvėpuoja endogeniškai, tuo metu vienintelis substratas yra bandomoji medžiaga, jei ji pati nebuvo lengvai įsisavinta. Šios savybės, kartu su sėjimo kultūros kasdieniu keitimu, kai terpe naudojamos buitinės nuotekos, užtikrina labai palankias aklimatizavimo sąlygas ir galimybę biologiškai skaidyti dideliu laipsniu.

1.6.3. *Bandymų eiga*

Iš tinkamo aktyviojo dumblo valymo įrenginio ar laboratorinio įrenginio, skirto valyti daugiausia buitines nuotekas, imamas nuotekų ir aktyviojo dumblo mišinys, kuris visą laiką, kol bus panaudotas laboratorijoje, laikomas aerobinėmis sąlygomis. Į kiekvieną aeravimo įrenginį ir į kontrolinį įrenginį įpilama po 150 ml šio mišinio (jei naudojamas originalus SCAS bandymo įtaisas, nurodytus tūrius reikia dauginti iš 10) ir pradedama aeruoti. Po 23 valandų aeravimas baigiamas ir dumblas 45 minutėms paliekamas nusistoti. Kiekvienas indas paeiliui atkemšamas, ir iš jo išsiurbiama 100 ml skysčio virš dumblo. Prieš pat naudojimą paimamas nusistojusių buitinių nuotekų bandinys, ir 100 ml nuotekų įpilama į kiekvieną aeravimo įrenginį su likusiu jame dumblu. Vėl pradedama aeruoti. Šioje pakopoje bandomoji medžiaga nededama, ir į įrenginius kasdieną pilama buitinių nuotekų tol, kol skystis virš nusistojusio dumblo tampa skaidrus. Tai dažniausiai trunka ne ilgiau kaip dvi savaites, per tą laiką ištirpusios organinės anglies kiekis skystyje virš dumblo kiekvieno aeravimo ciklo pabaigoje pasiekia pastovią vertę.

Kai šis laikotarpis baigiasi, atskirieji nusistojusio dumblo bandiniai yra sumaišomi ir į kiekvieną įrenginį dedama po 50 ml gauto sudėtinio dumblo.

Į kontrolinius įrenginius įpilama 95 ml nusistojusių nuotekų ir 5 ml vandens, į bandomuosius įrenginius įpilama 95 ml nusistojusių nuotekų ir 5 ml atitinkamos bandomosios medžiagos pradinio tirpalo (400 mg/litre). Aeruoti pradedama iš naujo ir aeravimas tęsiamas 23 valandas. Po to dumblas paliekamas 45 minutėms nusistoti, skystis virš dumblo nusiurbiamas ir jame nustatomas ištirpusios organinės anglies kiekis.

Aukščiau aprašytas užpylimo ir siurbimo procesas kartojamas kasdien iki bandymo pabaigos.

Prieš tai, kaip palikti dumblą nusistoti, gali jį tekti nuvalyti nuo įrenginio sienelių, kad kietosios dalelės nesikauptų virš skysčio. Norint išvengti kryžminio užkrėtimo, kiekvienas įrenginys turi turėti atskirą gremžtuką ar šepetį.

Geriausia būtų, kad ištirpusi organinė anglis skystyje virš dumblo būtų nustatoma kasdieną, nors analizę leidžiama daryti rečiau. Prieš analizę skysčiai filtruojami per išplautus 0,45 μm membraninius filtrus ar centrifuguojami. Membraniniai filtrai tinka, jei užtikrinama, kad filtravimo pakopoje jie neišskiria anglies ir nesugeria medžiagos. Centrifuguojamo bandinio temperatūra neturi būti didesnė kaip 40 °C.

Bandymo trukmė junginiams, kurie yra mažai skaidomi arba visiškai neskaidomi, nėra apibrėžta, tačiau patyrimas sako, kad dažniausiai tai turi trukti bent 12 savaičių, bet ne ilgiau kaip 26 savaitės.

2. DUOMENYS IR VERTINIMAS

Ištirpusios anglies kiekio vertės, nustatytos bandomųjų ir kontrolinių įrenginių skysčiuose virš nuosėdų, atidedamos grafiškai kaip laiko funkcija.

Baigus biologinį skaidymą, bandomajame įrenginyje nustatytas lygis artėja prie kontroliniame bandinyje rasto lygio. Kai skirtumas tarp abiejų lygių trijuose iš eilės matavimuose nekinta, dar daroma tiek matavimų, kiek jų pakanka duomenims statistiškai apdoroti, ir skaičiuojama bandomosios medžiagos biologinio skaidymo procentinė vertė (D_{ds} ar D_{ssd}, žr. 1.2).

3. **ATASKAITA**

3.1. **Bandymų ataskaita**

Bandymų ataskaitoje turi būti pateikta, jei įmanoma, tokia informacija:

— visa informacija apie nuotekų prigimtį, naudoto įrenginio tipą ir eksperimentiniai rezultatai, gauti bandomajai medžiagai, etaloninei medžiagai, jei buvo naudojama, ir tuščiajam bandiniui,

— temperatūra,

— šalinimo kreivė su aprašymu, skaičiavimo būdu (žr. 1.2),

— data ir vieta, kur buvo imti aktyviojo dumblo ir nuotekų bandiniai, adaptavimo būsena, koncentracija ir t. t.,

— mokslinis bet kokių bandymų metodikos keitimų pagrindimas,

— parašas ir data.

3.2. **Duomenų interpretavimas**

Kadangi medžiaga, skirta šiuo metodu bandyti, biologiškai nėra lengvai skaidoma, bet koks DOC šalinimas vien tik dėl biologinio skaidymo paprastai vyksta laipsniškai dienas ar savaites, išskyrus tuos atvejus, kai įvyksta staigus aklimatizavimas, apie kurį rodo staigus išnykimas, įvykstantis po kelių savaičių.

Tačiau kartais svarbų vaidmenį gali vaidinti fizikocheminė adsorbcija; jos dalyvavimą rodo pridėtos DOC visiškas ar dalinis išnykimas bandymo pradžioje. Kas atsitinka vėliau, priklauso nuo kai kurių faktorių, pvz., adsorbcijos laipsnio, ir suspenduotų kietųjų dalelių koncentracijos išleidžiamajame ištakyje. Paprastai skirtumas tarp DOC koncentracijos kontrolinio bandinio ir bandomosios medžiagos skystyje virš nuosėdų laipsniškai didėja nuo pradinės mažos vertės ir toliau šis skirtumas pasiekęs naują vertę išlieka toks iki bandymo pabaigos, jei neįvyksta aklimatizavimas.

Jei reikia atskirti biologinį skaidymą (ar dalinį biologinį skaidymą) ir adsorbciją, būtina daryti tolesnius bandymus. Tai galima daryti įvairiais būdais, tačiau įtikinamiausias būdas yra pamatiniame bandyme (geriau, kad tai būtų respirometrinis bandymas) sėjimo kultūra naudoti skystį virš dumblo ar dumblą.

Bandomosios medžiagos, kurių neadsorbcinio DOC šalinimo vertes bandyme yra didelės, turi būti laikomos potencialiai biologiškai skaidomomis. Dalinis neadsorbcinis šalinimas rodo, kad cheminė medžiaga bent kažkiek yra biologiškai skaidoma.

Mažos ar nulinės DOC (COD) šalinimo vertės gali būti dėl mikroorganizmų inhibavimo bandomąja medžiaga, tai dar gali parodyti dumblo irimas ir jo praradimas, dėl ko skystis virš dumblo drumsčiasi. Bandymas turi būti pakartotas naudojant mažesnę bandomosios medžiagos koncentraciją.

Naudojant specifinį junginio analizės metodą ar bandomąsias medžiagas su žymėtais ^{14}C atomais, gali būti pasiektas didesnis jautrumas. Jei bandomasis junginys turi ^{14}C, $^{14}CO_2$ surinkimas patvirtintų, kad biologinis skilimas įvyko.

Kai duomenys pateikiami, kaip pirminio biologinio skaidymo rezultatai, turi būti paaiškinta, jei tai įmanoma, kaip pakito cheminė sandara, kad neliko pradinės bandomosios medžiagos atsako.

Turi būti pateiktas analizės metodo galiojimo patvirtinimas ir tuščiojo bandinio terpėje nustatyta skaidymo vertė.

4. **NUORODOS**

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.

1 Priedėlis

SCAS bandymas. Rezultatų pavyzdys

Medžiaga	C_T (mg/l)	$C_i - C_c$ (mg/l)[c]	Biologinio skaidymo procentinė vertė, D_{da}	Bandymo trukmė (paros)
4-acetilaminobenzensulfonatas	17,2	2,0	85	40
Tetrapropenbenzensulfonatas	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenolis	16,9	0,8	95,3	40
Dietilenglikolis	16,5	0,2	98,8	40
Anilinas	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentantetrakarboksilatas	17,9	3,2	81,1	120

2 Priedėlis

Bandymo aparato pavyzdys

1 paveikslas

