31988L0302

30.5.1988. EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS L 133/1

KOMISIJAS DIREKTĪVA 88/302/EEK

(1987. gada 18. novembris),

ar ko devīto reizi tehnikas attīstībai pielāgo Padomes Direktīvu 67/548/EEK par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Ekonomikas kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes Direktīvu 67/548/EEK (1967. gada 27. jūnijs) par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakošanu un marķēšanu [1], kura sesto reizi grozīta ar Direktīvu 79/831/EEK [2], un jo īpaši tās 19. pantu,

tā kā Direktīvas 67/548/EEK 3. panta 1. punkts paredz, ka vielu un preparātu fizikāli ķīmisko īpašību, toksicitātes un ekotoksicitātes noteikšanai izmanto V pielikumā norādītās metodes;

tā kā Direktīvas 67/548/EEK 3. panta 2. punkts paredz, ka vielas vai preparāta faktisko vai iespējamo apdraudējumu videi vērtē pēc VII un VIII pielikumā izklāstītajām īpašībām;

tā kā V pielikuma redakcijā, kas pievienota Komisijas Direktīvai 84/449/EEK [3], pašlaik ir iekļautas tikai tādas testa metodes, kas attiecas uz VII pielikumā aplūkotajām īpašībām, un tālab jāsniedz arī tādu testa metožu apraksts, kuras attiecas uz VIII pielikumā aplūkotajām īpašībām;

tā kā šīs direktīvas noteikumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi Komiteja, kas atbild par to, kā tehnikas attīstībai pielāgot direktīvas par tehnisko šķēršļu novēršanu bīstamu vielu un preparātu tirdzniecībā,

IR PIEŅĒMUSI ŠO DIREKTĪVU.

1. pants

Direktīvas 67/548/EEK V pielikumu papildina ar šīs direktīvas pielikuma tekstu.

2. pants

Dalībvalstis līdz 1988. gada 31. decembrim pieņem un publicē noteikumus, kas vajadzīgi, lai izpildītu šīs direktīvas prasības, un tūlīt par to informē Komisiju. Šos noteikumus dalībvalstis sāk piemērot ne vēlāk kā 1989. gada 30. jūnijā.

3. pants

Šī direktīva ir adresēta dalībvalstīm.

Briselē, 1987. gada 18. novembrī

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

Stanley CLINTON DAVIS

---

[1] OV 196, 16.8.1967., 1./67. lpp.
[2] OV L 259, 15.10.1979., 10. lpp.
[3] OV L 251, 19.9.1984., 1. lpp.

PIELIKUMS

Šeit aplūkotās testa metodes kalpo tādu toksisko un ekotoksisko īpašību noteikšanai, kuras norādītas Padomes Direktīvas 79/831/EEK VIII pielikumā. Turpmāk ir aplūkotas testa metodes, kas attiecas uz VIII pielikumā norādīto 1. un 2. līmeni, lai arī tās nav savstarpēji nodalītas atkarībā no piederības dažādiem līmeņiem.

SATURS

Lpp.

B DAĻA: Metodes toksicitātes noteikšanai 93

Vispārīgs ievads: B daļa 93

Subhroniskās toksicitātes noteikšana pēc perorālas aplikācijas – atkārtota perorāla aplikācija grauzējiem (90 dienu laikā) 97

Subhroniskās toksicitātes noteikšana pēc perorālas aplikācijas – atkārtota perorāla aplikācija dzīvniekiem, kas nepieder pie grauzēju sugām (90 dienu laikā) 101

Subhroniskās toksicitātes noteikšana pēc ārīgas aplikācijas – atkārtota ārīga aplikācija grauzējiem (90 dienu laikā) 105

Subhroniskās toksicitātes noteikšana pēc inhalācijas – toksicitātes noteikšana grauzējiem pēc atkārtotas inhalācijas (90 dienu laikā) 109

Teratogenitātes noteikšana grauzējiem un citu sugu dzīvniekiem 113

Hroniskās toksicitātes noteikšana 116

Kancerogenitātes noteikšana 121

Vienlaicīga hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes noteikšana 126

Toksicitātes ietekme uz vienas paaudzes reproduktīvo funkciju 132

Toksicitātes ietekme uz divu paaudžu reproduktīvo funkciju 136

Toksikokinētika 140

Mutagenitātes noteikšana kopā ar kancerogenitātes priekšnovērtējumu 144

— gēnu mutācijas Saccharomyces cerevisiae šūnās 144

— mitotiskā rekombinācija *Saccharomyces cerevisiae* šūnās 147

— gēnu mutāciju noteikšana zīdītāju šūnās *in vitro*..... 150

— DNS bojājumi un to reparācija – neprogrammēta DNS sintēze zīdītāju šūnās *in vitro*..... 153

— māshromatīdu apmaiņa zīdītāju šūnās *in vitro*..... 157

— ar dzimumu saistīto recesīvo letālo mutāciju noteikšana (*Drosopbila melanogaster*) 160

— zīdītāju šūnu transformācija *in vitro*..... 162

— dominanto letāļu noteikšana grauzējiem 165

— zīdītāju dzimumšūnu citoģenētika *in vivo*..... 168

— peļu plankumainības tests 171

— pārmantojamo translokāciju noteikšana pelēm 174

C DAĻA: Ekotoksicitātes noteikšanas metodes 177

Vispārīgs ievads: C daļa 177

Aļģu augšanas kavēšanas tests 178

Toksicitātes noteikšana sliekām: mākslīgās augsnes tests 184

Biodegradācija: Cāna-Vellena tests 188

Biodegradācija: aktīvo dūņu imitācijas testi 195

Biodegradācija: aktīvo dūņu respirācijas inhibīcijas tests 207

Biodegradācija: modificēts *SCAS* tests 212

B. DAĻA. METODES TOKSICITĀTES NOTEIKŠANAI

VISPĀRĪGS IEVADS: B DAĻA

ILGLAICĪGI PĒTĪJUMI

Subhroniskā, hroniskā toksicitāte un kancerogenitāte

Pārbaudāmās vielas un tās maisījumu raksturojums

Lai noteiktu pārbaudāmās vielas toksicitāti, iepriekš jānoskaidro tās sastāvs un galvenie piemaisījumi, kā arī svarīgākās fizikāli ķīmiskās īpašības, ieskaitot vielas noturīgumu.

Pārbaudāmās vielas fizikāli ķīmiskajām īpašībām ir svarīga nozīme, izvēloties tās ievadīšanas veidu, plānojot subhroniskās un hroniskās toksicitātes vai kancerogenitātes pētījumus, kā arī tās lietošanas un uzglabāšanas režīmu.

Pamatojoties uz datiem par vielas ķīmisko uzbūvi un fizikāli ķīmiskajām īpašībām, var arī spriest par tās absorbcijas īpatnībām, izmantojot paredzēto ievadīšanas veidu, kā arī par vielas un tās metabolītu iespējamo izplatīšanos audos. Datus par vielas toksikokinētiskajiem parametriem var iegūt arī no iepriekšējiem toksicitātes un toksikokinētikas pētījumiem.

Pirms uzsākt izpēti, jāizstrādā analītiskās metodes pārbaudāmās vielas (ja iespējams, arī tās galveno piemaisījumu) kvalitatīvajai un kvantitatīvajai noteikšanai ievadāmajā maisījumā un bioloģiskajā materiālā.

Izmēģinājumu dzīvnieki – dzīvnieku sugu un līniju izvēle

Tā kā dzīvniekus pakļauj vielas iedarbībai gandrīz visa mūža garumā, parasti pētījumos cenšas izmantot tādu sugu dzīvniekus, kuru mūžs ir samērā īss un kuru turēšana nesagādā grūtības. Būtu ļoti vēlams zināt, cik bieži izmantoto līniju dzīvniekiem spontāni rodas slimības un audzēji, kad tos tur līdzīgos apstākļos.

Dzīvnieku līnijām jābūt labi izpētītām un bez iedzimtiem defektiem. Šajā ziņā zināmas priekšrocības ir inbredlīnijām un F_1 hibrīdiem, lai gan izmantošanai der arī autbredlīniju dzīvnieki, kas veido noslēgtu populāciju, ja vien par tiem ir uzkrāts pietiekami daudz pamatdatu.

Dzīvnieku aprūpe, nodrošināšana ar uzturu un ūdeni

Izmēģinājumus un pētījumus ar dzīvniekiem veic saskaņā ar attiecīgās valsts tiesību aktiem, ievērojot humānas attieksmes principus un jaunākos sasniegumus dzīvnieku labturības jomā citur pasaulē.

Lai iegūtu ticamus rezultātus, stingri jākontrolē apkārtējie apstākļi un jāizmanto piemērotas dzīvnieku aprūpes metodes. Ja pārbaudāmo vielu ievada atkārtoti, tādi faktori kā dzīvnieku turēšanas apstākļi, nejaušas slimības, ārstēšana ar zālēm, piemaisījumi uzturā, gaisā vai ūdenī, izmantotie pakaiši un vispārējie dzīvnieku aprūpes apstākļi var ievērojami ietekmēt pētījumu iznākumu. Vispār jāzina, kā ķīmiskie sterilizācijas līdzekļi iespaido pētījumu rezultātus.

Uzturam jāatbilst visām izmantoto dzīvnieku sugu prasībām attiecībā uz uzturvielām un tajā nedrīkst būt piemaisījumi, kas var ietekmēt testa rezultātus. Grauzēji saņem barību un ūdeni *ad libitum*, turklāt vismaz reizi nedēļā barība jāatjauno. Pašlaik izmanto trīs uztura veidus – parasto, sintētisko un dažādas "īpaša sastāva formulas".

Neatkarīgi no izvēlētā uztura piegādātājiem regulāri jāuzrauga pamatbarības uzturvērtība un piemaisījumu līmenis un šī informācija jāpievieno katrai barības partijai, ko saņem laboratorija. Būtu ļoti vēlams noskaidrot, kā uztura režīms ietekmē vielmaiņu, kā arī audzēju attīstību un dzīvnieku mūža ilgumu.

Bez tam testu laboratorija var veikt pamatbarības kontrolanalīzes, lai noteiktu uzturlīdzekļu sastāvdaļas un nejaušus piemaisījumus, tostarp kancerogēnus. Šajā gadījumā analīžu rezultāti jāsaglabā un jāiekļauj galīgajā ziņojumā, ko sagatavo pēc katras vielas testa.

Plaši izplatītos uztura komponentus, kas veicina kanceroģenēzi (piem., antioksidantus, nepiesātinātās taukskābes, selēnu), nedrīkst ietvert uzturā iedarbīgā koncentrācijā. Tā kā vairāki plaši izplatītie uztura piemaisījumi, iespējams, ietekmē kancerogenitātes testa rezultātus, īpaša uzmanība jāvelta pesticīdu atlieku, hlororganisko savienojumu, policiklisko aromātisko ogļūdeņražu, estrogēnu, smago metālu, nitrozamīnu un mikotoksīnu noteikšanai uzturā.

Ja pārbaudāmo vielu pievieno ūdenim vai barībai, ir svarīgi pārbaudīt vielas noturīgumu. Pirms pētīt atkārtotas devas iedarbību, pienācīgi jāpārbauda vielas noturīgums un homogenitāte, lai noteiktu uztura pagatavošanas un uzraudzības biežumu.

Ja uzturu sterilizē, ir jānoskaidro, kā sterilizācija ietekmē pārbaudāmo vielu un uztura komponentus. Vajadzības gadījumā šī procedūra attiecīgi jākoriģē.

Veicot kancerogenitātes testu, pētniekiem jāapzinās, ka izmantotais ūdens var saturēt piesārņojumus. Parasti šim nolūkam der ūdens, kas paredzēts lietošanai pārtikā, un jābūt pieejamiem datiem par tā sastāvu.

Var gadīties, ka, dzīvniekiem augot, pārbaudāmās vielas koncentrācija uzturā ir jākoriģē, lai nodrošinātu pietiekami nemainīgu pārbaudāmās vielas uzņemšanu attiecībā uz ķermeņa svaru.

Barības uzturvērtībai, ko saņem kontroles un izmēģinājumu dzīvnieki, jābūt pēc iespējas līdzīgai. Tātad ir jāņem vērā uzturam pievienotās pārbaudāmās vielas uzturvērtība. Pieredze rāda, ka, pārbaudāmā viela, kurai nav uzturvērtības, parasti neatstāj ievērojamu ietekmi uz barības uzturvērtību, ja tās saturs nepārsniedz 5 %.

1. **Iedarbība pēc inhalācijas**

Metode iedarbīguma robežas noteikšanai nepastāv, jo līdz šim nav izdevies noteikt vienotu inhalācijas iedarbīguma robežu.

2. **Teratogenitātes pētījumi**

Šī testa metode galvenokārt balstās uz perorālu ievadīšanu. Pastāv arī iespēja izmantot citus ievadīšanas veidus, ko nosaka pārbaudāmās vielas fizikālās īpašības vai tas, kādā veidā tā parasti iekļūst cilvēku organismā. Šādos gadījumos testa metode atbilstoši jākoriģē, ņemot vērā attiecīgos kritērijus, kas ir 28 dienu ilgā testa pamatā.

3. **Toksikokinētika**

Toksikokinētiskie pētījumi atvieglo toksicitātes datu interpretāciju un izvērtēšanu. Šie pētījumi ļauj noskaidrot konkrētus jautājumus saistībā ar pārbaudāmās ķīmiskās vielas toksicitāti, un to rezultāti var palīdzēt plānot tālākus toksicitātes pētījumus. Katrā atsevišķā gadījumā nav jānosaka visi parametri. Tikai retos gadījumos ir jāveic pilnīga un secīga visu toksikokinētisko parametru (absorbcijas, izdalīšanas, izplatīšanās organismā un metabolisma) izpēte. Testējot dažus savienojumus, ieteicams izdarīt izmaiņas šajā secībā vai arī pietiek ar vienas devas ievadīšanu.

Definīcijas

Toksikokinētika	pēta pārbaudāmo vielu absorbciju, izplatīšanos organismā, to metabolismu un izdalīšanos.
Absorbcija	ir vielas uzsūkšanās un asimilācija pēc tās ievadīšanas organismā.
Ekskrēcija	ir ievadītas vielas un/vai tās metabolītu izvadīšana no organisma.
Izplatīšanās	organismā ir ievadītas vielas un/vai tās metabolītu izplatīšanās audos un orgānos.
Metabolisms	ir vielmaiņas procesi, kuru ietekmē notiek izmaiņas ievadītu vielu struktūrā, tām iesaistoties fermentatīvās vai nefermentatīvās reakcijās.

4. **Akūtas un subakūtas iedarbības pētījumi ar citas sugas dzīvniekiem**

Pētījumi, kuros izmanto citas sugas dzīvniekus, ļauj papildināt secinājumus, kas izdarīti pēc iepriekšējiem pētījumiem.

Veicot šādus pētījumus, var izmantot jau iepriekš norādīto testa metodi vai pielāgot to mazākam dzīvnieku skaitam.

5. **Auglības pētījumi**

Ja reproduktīvās funkcijas tests aptver trīs paaudzes, metodi, kas norādīta divu paaudžu reproduktīvās funkcijas testam, var piemērot arī trešajai paaudzei.

6. **Mutagenitātes pētījumi**

Mutagenitātes papildu testi kopā ar kancerogenitātes priekšnovērtējumu

Direktīvas VIII pielikumā ir minētas papildu pārbaudes mutagenitātes padziļinātai izpētei vai kancerogenitātes priekšnovērtējumam. Šajā iedaļā minētās pārbaudes parasti var izmantot abiem minētajiem mērķiem.

Ievads

Vielas mutagēnās iedarbības sākotnējā novērtēšana paredz gēnu mutāciju (punktmutāciju) noteikšanu baktērijām un citoģenētisko bojājumu noteikšanu zīdītāju šūnās (*in vitro* vai *in vivo*); metodes, kas izmantojamas šajos pamatpētījumos, ir aplūkotas iepriekš. Šajā iedaļā ir iztirzāti papildu pētījumi, kas var kalpot kā apstiprinājums un/vai papildinājums rezultātiem, kuri gūti pamatpētījumos, un tie ir izmantojami vairākiem mērķiem:

1. pamatpētījumos iegūto rezultātu apstiprināšanai;

2. pamatpētījumos neizpētītu parametru noskaidrošanai;

3. *in vivo* pētījumu ierosināšanai vai papildināšanai.

Aplūkoto testu diapazons aptver eikariotu sistēmas gan *in vitro*, gan *in vivo*, kā arī paredz lielāku bioloģisko parametru skaitu. Šie testi ļauj iegūt informāciju par punktmutācijām organismos, kam ir sarežģītāka uzbūve nekā pamatpētījumos izmantotajām baktērijām, un sniedz sīkākus datus par vielas spēju inducēt hromosomu aberācijas.

Ir aplūkotas arī citas testa metodes, kas kalpo ne tikai punktmutāciju un hromosomu aberāciju noteikšanai. Tās ļauj iegūt papildu datus un vajadzības gadījumā ir iekļaujamas testu shēmās.

Apsverot tālāko mutagenitātes pētījumu programmu, jāievēro vispārējs princips, ka tai jānodrošina papildu informācija par attiecīgās vielas mutagenitāti un/vai kancerogenitāti.

Faktiski veicamie pētījumi katrā konkrētā gadījumā būs atkarīgi no daudziem faktoriem, piemēram, no vielas ķīmiskajām un fizikālajām īpašībām, iepriekšējiem pētījumiem ar baktērijām un citoģenētikas pētījumiem, vielas metabolisma īpatnībām, citu toksicitātes pētījumu rezultātiem, kā arī no zināmiem vielas izmantošanas veidiem. Tādēļ pārāk stingra testu atlases shēma ir nepieņemama, ņemot vērā daudzos faktorus, kuri reizēm ir jāpatur prātā. Tomēr daži vispārēji principi var ieviest zināmu skaidrību. Ja viens no pamatpētījumiem uzrāda pozitīvus rezultātus, papildu pētījumos ir jāiekļauj vismaz viena metode, ar kuru var pārbaudīt to pašu ģenētisko parametru. Ja abi pamatpētījumi izrādās negatīvi, kā papildu pētījumu parasti izmanto gēnu mutāciju un hromosomu aberāciju noteikšanu. Var gadīties, ka ir lietderīgi iegūt papildu datus, izmantojot tālāk norādītos indikatortestus.

Šādas izpētes metodes šeit apkopotas, balstoties uz galvenajiem pārbaudāmajiem ģenētiskajiem parametriem.

Gēnu mutāciju (punktmutāciju) noteikšana

Lai sīkāk izpētītu vielas spēju izraisīt gēnu mutācijas (punktmutācijas), var izvēlēties vienu no šeit minētajām metodēm:

a) turpvērsto vai atpakaļvērsto mutāciju noteikšana eikariotiskajiem mikroorganismiem (*Saccharomyces cerevisiae*);

b) turpvērsto mutāciju noteikšana zīdītāju šūnās *in vitro*;

c) ar dzimumu saistīto recesīvo letālo mutāciju noteikšana (*Drosophila melanogaster*);

d) mutāciju noteikšana somatiskajās šūnās *in vivo* – peļu plankumainības tests.

Hromosomu aberāciju noteikšana

Lai sīkāk izpētītu vielas spēju izraisīt hromosomu aberācijas, var izvēlēties vienu no šeit minētajām testa metodēm:

a) zīdītāju citoģenētiskā analīze *in vivo*;

šim nolūkam ieteicams analizēt metafāzes plātnes, kas iegūtas no kaula smadzeņu šūnām *in vivo*, ja tas nav izdarīts, veicot sākotnējo pārbaudi (pamatpētījumus); bez tam var citoģenētiski izmeklēt dzimumšūnas *in vivo*;

b) zīdītāju šūnu citoģenētiskā izpēte *in vitro*, ja tas nav izdarīts, veicot sākotnējo pārbaudi;

c) dominanto letāļu noteikšana grauzējiem;

d) pārmantojamo translokāciju noteikšana pelēm.

Indikatortesti, pētot iedarbību uz DNS

Ir pieejamas metodes, ar kurām var noteikt, ka viela iedarbojas uz DNS, lai gan tā rezultātā nerodas mutācijas. Šie pētījumi var papildināt informāciju, kas gūta mutagenitātes pētījumos, un var būt noderīgi, interpretējot šādu pētījumu rezultātus. Ja rodas vajadzība pēc šādiem pētījumiem, var izvēlēties kādu no šeit minētajām metodēm, kas paredz eikariotisko mikroorganismu vai zīdītāju šūnu izmantošanu:

a) mitotiskā rekombinācija *Saccharomyces cerevisiae* šūnās;

b) DNS bojājumi un to reparācija – neprogrammēta DNS sintēze – zīdītāju šūnās (*in vitro*);

c) māshromatīdu apmaiņa zīdītāju šūnās (*in vitro*).

Citi indikatortesti kancerogenitātes noteikšanai

Ir pieejamas metodes, ar kurām var noteikt zīdītāju šūnu transformāciju, kas ļauj kvantitatīvi novērtēt vielas spēju inducēt izmaiņas šūnu kultūru morfoloģijā un vairošanās dinamikā, kuras saista ar šūnu ļaundabīgo transformāciju *in vivo*. Var izmantot virkni dažādu šūnu tipu un transformācijas kritēriju.

Riska novērtēšana attiecībā uz ģenētiski pārmantojamiem defektiem zīdītājos

Pastāv metodes, ar kurām zīdītājiem var noteikt tādus ģenētiski pārmantojamus defektus, kas radušies gēnu mutāciju (punktmutāciju) (specifisko lokusu noteikšana pelēm [1]) vai hromosomu aberāciju (ģenētiski pārmantojamo translokāciju noteikšana pelēm) rezultātā. Šīs metodes var izmantot, lai izvērtētu ģenētisko risku, ko cilvēkiem var radīt kāda viela. Tomēr, ņemot vērā, ka šie testi ir visai sarežģīti un to veikšanai ir nepieciešams ļoti liels dzīvnieku skaits, jo īpaši specifisko lokusu noteikšanai, šo pētījumu uzsākšana nav iedomājama bez pārliecinoša pamatojuma.

---

[1] Specifisko lokusu noteikšanu pelēm (šī metode nav aplūkota šajā dokumentā) var veikt, lai pārbaudītu mutācijas dzimumšūnās pirmajā paaudzē pēc mutagēnas vielas iedarbības. Ar šo metodi iespējams atklāt un kvantitatīvi noteikt ģenētiskās izmaiņas, kas noved pie izmaiņām gēnu produktos un ietekmē fenotipu.

SUBHRONISKĀS TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA PĒC PERORĀLAS APLIKĀCIJAS

ATKĀRTOTA PERORĀLA APLIKĀCIJA GRAUZĒJIEM (90 DIENAS)

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcijas

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Pārbaudāmo vielu dažādās devās katru dienu 90 dienu laikā perorāli ievada izmēģinājumu dzīvniekiem, kas sadalīti vairākās grupās, un vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu. Ekspozīcijas laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Dzīvniekus, kas miruši izmēģinājuma laikā, secē un, beidzoties izmēģinājumam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus un jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma sadala apstrādes un kontroles grupās.

Pārbaudāmo vielu var pievienot barībai, ievadīt ar zondi, kapsulās vai pievienot dzeramajam ūdenim. Visu izmēģinājuma laiku dzīvnieki saņem pārbaudāmo vielu pēc vienādas shēmas. Ja izmanto šķīdinātāju vai citas piedevas, kas atvieglo pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, ir jāpārliecinās, ka tām nepiemīt toksiska iedarbība. Vajadzības gadījumā var izmantot agrāk iegūtus datus.

Testa apstākļi

Izmēģinājumu dzīvnieki

Ja nav kontrindikāciju, vēlams izmantot žurkas. Jāizmanto jauni un veseli dzīvnieki, kas pieder pie plaši izmantojamām laboratorijas dzīvnieku līnijām, kamēr tie nav sasnieguši 6 nedēļu vecumu, un jebkurā gadījumā žurku vecums nedrīkst pārsniegt 8 nedēļas. Uzsākot izmēģinājumus, dzīvnieku ķermeņa svara svārstības nedrīkst būt lielākas par ± 20 % no vidējā svara. Ja subhroniskās toksicitātes pārbaudi pēc perorālas aplikācijas veic pirms ilglaicīgas pārbaudes, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas un līnijas dzīvnieki.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Vienu un to pašu devu ievada vismaz 20 (10 sieviešu un 10 vīriešu kārtas) dzīvniekiem. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī izmēģinājuma laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nokauti izmēģinājuma gaitā. Bez tam var izveidot papildu grupu no 20 dzīvniekiem (pa 10 no katra dzimuma), kas 90 dienas saņem lielāko devu, un pēc aplikācijas 28 dienu laikā novēro, vai toksiskā iedarbība ir atgriezeniska, noturīga vai novēlota.

Izmantotās devas

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, un jābūt kontroles grupai. Ar kontroles grupas dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat, kā ar pārējiem dzīvniekiem, bet tie nesaņem pārbaudāmo vielu. Ja izmanto šķīdinātāju, lai atvieglotu pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, kontroles dzīvnieki saņem tādu pašu daudzumu šķīdinātāja kā dzīvnieki, kas saņem lielāko vielas devu. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska, bet kas neizraisa vai gandrīz neizraisa dzīvnieku nāvi. Viela vismazākajā devā nedrīkst būt toksiska. Ja ir pieejami aptuveni dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielās devas toksiskums izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla devas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai.

Dzīvnieku grupās, kas saņem mazo un vidēji lielo devu, jābūt zemam mirstības līmenim, lai varētu statistiski novērtēt rezultātus.

Ja pārbaudāmo vielu pievieno barībai, vielas koncentrācijai barībā (ppm vai mg/kg barības) jābūt nemainīgai vai jāizmanto deva, kas ir nemainīga attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru; jebkura atkāpe no šīs shēmas ir jāpamato. Ja vielu ievada ar zondes palīdzību, to katru dienu ievada vienādā laikā. Izmantotās devas ir jākoriģē pēc noteikta laika posma (ik pēc nedēļas vai ik pēc divām nedēļām), lai tās būtu nemainīgas attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Ja 90 dienu ilgajā testā, ko veic pēc tālāk aplūkotās metodes, izmanto vienu devu, kas ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā vai pat lielāka, un tā atbilst devai, ar kādu parasti saskaras cilvēki (ja tāda deva ir zināma), un vielai šajā devā nav novērota toksiska iedarbība, var uzskatīt, ka tālāka testēšana nav nepieciešama. Ja maztoksiskas vielas pievieno barībai, ir svarīgi pārliecināties, ka pārbaudāmās vielas daudzums vai citas tās īpašības neiespaido ierasto uztura režīmu.

Novērošanas periods

Dzīvniekus novēro katru dienu, reģistrējot toksiskuma pazīmes, kā arī to parādīšanās brīdi, pakāpi un ilgumu. Jāreģistrē nāves iestāšanās brīdis, kā arī laiks, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

Testa norise

Dzīvnieki parasti saņem pārbaudāmo vielu 7 dienas nedēļā 90 dienu laikā. Dzīvnieki papildu grupās, kas paredzētas tālākai novērošanai, turpmākās 28 dienas nesaņem pārbaudāmo vielu, lai varētu izsekot, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā iedarbība.

Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar to ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Katru nedēļu jānosaka barības patēriņš (un ūdens patēriņš, ja pārbaudāmo vielu pievieno dzeramajam ūdenim), un dzīvnieki katru nedēļu jānosver.

Pastāvīga dzīvnieku novērošana ļauj iespēju robežās samazināt izmēģinājumu dzīvnieku bojāeju kanibālisma, audu autolīzes vai nepareizu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties izmēģinājumam, visus izdzīvojušos dzīvniekus, izņemot papildu grupas dzīvniekus, secē. Pamanot mirstošus dzīvniekus, tos uzreiz nošķir no pārējiem un secē.

Visus dzīvniekus, tostarp arī kontroles dzīvniekus, parasti pakļauj šādām pārbaudēm:

a) Pirms pārbaudāmās vielas aplikācijas un izmēģinājuma beigās jāveic ja ne visu dzīvnieku, tad vismaz to, kas saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvnieku oftalmoloģiskā izmeklēšana, izmantojot oftalmoskopu vai piemērotu līdzvērtīgu aparātu. Ja novēro izmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki.

b) Beidzoties izmēģinājumam, jāveic hematoloģiskā izmeklēšana, ieskaitot hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocītu formulas, kā arī asins recēšanas spēju, piemēram, recēšanas laika, protrombīna laika, tromboplastīna laika vai trombocītu skaita noteikšanu.

c) Beidzoties izmēģinājumam, jāveic arī asins klīniskās bioķīmijas izmeklējumi. Šie izmeklējumi visos gadījumos attiecas uz elektrolītu sastāvu, ogļhidrātu metabolismu, aknu un nieru darbību. Atsevišķu analīžu izvēle ir atkarīga no konkrētās vielas iedarbības veida. Ieteiktās analīzes ietver kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija,

kālija, glikozes pēc badošanās (badošanās ilgums ir atkarīgs no dzīvnieku sugas), seruma glutamātpiruvāttransamināzes ([1]), seruma glutamātoksalacetāttransamināzes ([2]), ornitīndekarboksilāzes, *gamma*-glutamiltranspeptidāzes, urīnvielas slāpekļa, albumīna, plazmas kreatinīna, kopējā bilirubīna un seruma olbaltumvielu noteikšanu. Citas analīzes, kas jāveic, lai gūtu vispusīgu toksikoloģisko novērtējumu, paredz lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu. Vajadzības gadījumā var veikt arī citas klīniskās bioķīmijas analīzes, lai padziļināti izpētītu vielas iedarbību.

d) Urīnanalīze parasti nav jāveic, ja vien nepastāv varbūtība, ka viela var būt toksiska, vai to apstiprina novērojumi.

Ja agrāk iegūtie dati ir nepietiekami, pirms uzsākt izmēģinājumu, jāapsver iespēja noteikt hematoloģiskos un klīniskās bioķīmijas rādītājus.

Autopsija

Visiem dzīvniekiem veic pilnu autopsiju, kas paredz ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru, kā arī galvaskausa, krūškurvja un vēdera dobuma un to satura apskati. Aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši.

Piemērotā vidē jāsaglabā šādi orgāni un audi, lai turpmāk būtu iespējama to histopatoloģiskā izmeklēšana: visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes, ieskaitot iegarenās smadzenes/tiltu, smadzenīšu garozu un smadzeņu garozu, hipofīze, vairogdziedzeris/epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzera audi, traheja un plaušas, sirds, aorta (siekalu dziedzeri), aknas, liesa, nieres, virsnieru dziedzeri, aizkuņģa dziedzeris, gonādas, dzemde (papildu dzimumorgāni), (āda), barības vads, kuņģis, divpadsmitpirkstu zarna, tukšā zarna, līkumainā zarna, aklā zarna, lokzarna, taisnā zarna, urīnpūslis, limfmezglu paraugi, (sievišķais piena dziedzeris), (augšstilba muskulatūra), perifērās nervu sistēmas nervi, krūškauls ar kaula smadzenēm, (acis), (augšstilba kauls ar locītavas virsmu), (triju līmeņu muguras smadzenes – no kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona) un (ārpusorbītas asaru dziedzeri). Iekavās iekļautie audi jāpārbauda tikai tad, ja novēro toksiskuma pazīmes vai viela iedarbojas tieši uz šo orgānu.

Histopatoloģiskā izmeklēšana

a) Vispusīga orgānu un audu histopatoloģiskā izmeklēšana veicama visiem kontroles dzīvniekiem un dzīvniekiem, kas saņēmuši lielāko vielas devu.

b) Jāizpēta visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem.

c) Iedarbības skartie orgāni jāizmeklē arī pārējās dzīvnieku grupās.

d) Histopatoloģiski jāizmeklē infekcijas klātbūtne plaušās dzīvniekiem, kam ievadīta mazā un vidēji lielā deva, jo šādi var ērti novērtēt dzīvnieku veselības stāvokli. Tāpat jāapsver, vai būtu histopatoloģiski jāizmeklē aknas un nieres šo grupu dzīvniekiem. Turpmākā histopatoloģiskā izmeklēšana šo grupu dzīvniekiem parasti nav jāveic, bet to obligāti veic dzīvniekiem, kam ievadīta lielā deva, un tā skar orgānus, kuros novēroti bojājumi.

e) Ja izmanto papildu grupu, histopatoloģiski jāizmeklē audi un orgāni, uz kuriem iedarbojas pārbaudāmā viela apstrādāto dzīvnieku grupās.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam novēroti bojājumi, un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katra tipa bojājumiem. Iegūtie rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,

— testa apstākļi,

— izmantotās devas (jānorāda arī šķīdinātājs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— toksiskās reakcijas atkarībā no dzimuma un devas,

([1]) Pašreizējais nosaukums – seruma alanīnaminotransferāze.
([2]) Pašreizējais nosaukums – seruma aspartātaminotransferāze.

— netoksiska deva, ja var noteikt,
— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,
— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,
— saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,
— dati par barības patēriņu un ķermeņa svaru,
— oftalmoloģijas dati,
— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,
— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un iegūtie dati (arī urīnanalīzes rezultāti, ja tādi ir),
— autopsijas rezultāti,
— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,
— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,
— rezultātu iztirzājums,
— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

SUBHRONISKĀS TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA PĒC PERORĀLAS APLIKĀCIJAS

ATKĀRTOTA PERORĀLA APLIKĀCIJA DZĪVNIEKIEM, KAS NEPIEDER PIE GRAUZĒJU SUGĀM (90 DIENAS)

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcijas

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Pārbaudāmo vielu dažādās devās katru dienu 90 dienu laikā perorāli ievada izmēģinājumu dzīvniekiem (kas nepieder pie grauzējiem), kas sadalīti vairākās grupās, un vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu. Ekspozīcijas laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Dzīvniekus, kas miruši izmēģinājuma laikā, secē un, beidzoties izmēģinājumam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus un jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās.

Pārbaudāmo vielu var pievienot uzturam vai ievadīt kapsulās, ja tā ir ērtāk. Var izmantot arī citus perorālas aplikācijas veidus. Visu izmēģinājuma laiku pārbaudāmā viela dzīvniekiem jāsaņem pēc vienādas shēmas. Ja izmanto šķīdinātāju vai citas piedevas, kas atvieglo pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, ir jāpārliecinās, ka tām nepiemīt toksiska iedarbība. Vajadzības gadījumā var izmantot agrāk iegūtus datus.

Testa apstākļi

Izmēģinājumu dzīvnieki

Visplašāk izmantotie dzīvnieki, kas nepieder pie grauzējiem, ir suņi; ieteicams izmantot noteiktas šķirnes suņus. Šim nolūkam der arī citu sugu dzīvnieki, kas nav grauzēji. Jāizmanto jauni un veseli dzīvnieki, un, ja tie ir suņi, vispiemērotākais vecums ir no 4 līdz 6 mēnešiem, bet ne lielāks par 9 mēnešiem. Ja subhroniskās toksicitātes testu pēc perorālas aplikācijas veic pirms ilglaicīgā testa, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas/šķirnes dzīvnieki.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Vienu un to pašu vielas devu ievada vismaz 8 (4 sieviešu un 4 vīriešu kārtas) dzīvniekiem. Dzīvnieku skaitam izmēģinājuma beigās jābūt pietiekami lielam, lai varētu statistiski izvērtēt toksiskās iedarbības rezultātus.

Izmantotās devas

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, un jābūt kontroles grupai. Ar kontroles grupas dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat, kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem pārbaudāmo vielu. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska, bet kas neizraisa dzīvnieku nāvi. Vielas mazākā deva nedrīkst būt toksiska.

Ja ir pieejami aptuveni dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielās devas toksiskums izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla devas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai.

Grupās, kurās dzīvniekiem ievadīta mazā un vidēji lielā deva, arī nedrīkst būt nāves gadījumu.

Ja maztoksiskas vielas pievieno uzturam, ir svarīgi pārliecināties, ka pārbaudāmās vielas daudzums neiespaido ierasto uztura režīmu.

Ja pārbaudāmo vielu pievieno uzturam, vielas koncentrācijai barībā (ppm vai mg/kg barības) jābūt nemainīgai vai jāizmanto deva, kas ir nemainīga attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru; jebkura atkāpe no šīs shēmas ir jāpamato. Ja vielu ievada tiešā veidā, piem., kapsulā, to katru dienu ievada tajā pašā laikā, vajadzības gadījumā ik pēc nedēļas pielāgojot devu, lai tā būtu nemainīga attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru. Ja subhroniskās toksicitātes testu veic pirms ilglaicīga testa, parasti abos pētījumos jānodrošina līdzīgs uzturs.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Ja 90 dienu ilgajā pārbaudē, ko veic pēc turpmāk aplūkotās metodes, izmanto vienu devu, kas ir 1 000 mg/kg ķermeņa svara dienā vai pat lielāka, un tā atbilst devai, ar kādu parasti saskaras cilvēki (ja tāda deva ir zināma), un vielai šajā devā nav novērota toksiska iedarbība, var uzskatīt, ka turpmāka testēšana nav nepieciešama. Ja maztoksiskas vielas pievieno barībai, ir svarīgi pārliecināties, ka pārbaudāmās vielas daudzums vai citas tās īpašības neiespaido ierasto uztura režīmu.

Novērošanas periods

Dzīvniekus novēro katru dienu, reģistrējot toksiskuma pazīmes, kā arī to parādīšanās brīdi, pakāpi un ilgumu. Jāreģistrē nāves iestāšanās brīdis, kā arī laiks, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

Testa norise

Dzīvnieki parasti saņem pārbaudāmo vielu 7 dienas nedēļā 90 dienu laikā. Tomēr, galvenokārt aiz praktiskiem apsvērumiem, ja vielu nepievieno uzturam, uzskata, ka ir pieļaujama tās ievadīšana piecas dienas nedēļā.

Novērojot dzīvniekus, galvenā uzmanība jāpievērš izmaiņām, kas skar ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, vegetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku, uzvedības reakcijas. Katru nedēļu jānosaka barības patēriņš (un ūdens patēriņš, ja pārbaudāmo vielu pievieno dzeramajam ūdenim), un dzīvnieki katru nedēļu jānosver.

Katru dienu dzīvniekus pakļauj rūpīgai klīniskajai pārbaudei un gādā par to, lai samazinātu dzīvnieku zudumus izmēģinājuma laikā. Beidzoties ekspozīcijas laikam, visus izdzīvojušos dzīvniekus secē. Pamanot mirstošus dzīvniekus, tos uzreiz nošķir no pārējiem un secē.

Visus dzīvniekus, tostarp arī kontroles dzīvniekus, parasti pakļauj šādām pārbaudēm:

a) Pirms pārbaudāmās vielas aplikācijas un izmēģinājuma beigās jāveic ja ne visu dzīvnieku, tad vismaz to, kas ir saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvnieku oftalmoloģiskā izmeklēšana, izmantojot oftalmoskopu vai piemērotu līdzvērtīgu aparātu. Ja novēro izmaiņas acīs, ir jāpārbauda visi dzīvnieki.

b) Izmēģinājuma sākumā un pēc tam ik pēc mēneša vai izmēģinājuma vidū un visbeidzot izmēģinājuma beigās jāveic hematoloģiskā izmeklēšana, kas ietver hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocītu formulas, kā arī asins recēšanas spēju, piemēram, recēšanas laika, protrombīna laika, tromboplastīna laika vai trombocītu skaita noteikšanu.

c) Asins klīniskās bioķīmijas izmeklējumi jāveic izmēģinājuma sākumā, pēc tam ik pēc mēneša vai izmēģinājuma vidū un visbeidzot izmēģinājuma beigās. Šie izmeklējumi visos gadījumos attiecas uz elektrolītu sastāvu, ogļhidrātu metabolismu, aknu un nieru darbību. Atsevišķu analīžu izvēle ir atkarīga no konkrētās vielas iedarbības veida. Ieteiktās analīzes ietver kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, glikozes pēc badošanās (badošanās ilgums ir atkarīgs no dzīvnieku sugas/šķirnes), seruma glutamātpiruvāttransamināzes ([1]), seruma glutamātoksalacetāttransamināzes ([2]), ornitīndekarboksilāzes, *gamma*-glutamiltranspeptidāzes, urīnvielas slā

([1]) Pašreizējais nosaukums – seruma alanīnaminotransferāze.
([2]) Pašreizējais nosaukums – seruma aspartātaminotransferāze.

pekļa, albumīna, plazmas kreatinīna, kopējā bilirubīna un seruma olbaltumvielu noteikšanu. Citas analīzes, kas jāveic, lai gūtu vispusīgu toksikoloģisko novērtējumu, paredz lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu. Vajadzības gadījumā var veikt arī citas klīniskās bioķīmijas analīzes, lai padziļināti izpētītu vielas iedarbību. Pirms asins paraugu ņemšanas dzīvniekiem, ja tie nav grauzēji, kādu laiku (ne ilgāk kā 24 stundas) jābadojas.

d) Urīnanalīze parasti nav jāveic, ja vien nepastāv varbūtība, ka viela var būt toksiska, vai to apstiprina novērojumi.

Autopsija

Visiem dzīvniekiem veic pilnu autopsiju, kas paredz ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru, kā arī galvaskausa, krūškurvja un vēdera dobuma un to satura apskati. Aknas, nieres, virsnieru dziedzerus, vairogdziedzeri (kopā ar epitēlijķermenīšiem) un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši.

Piemērotā vidē jāsaglabā šādi orgāni un audi, lai turpmāk būtu iespējama to histopatoloģiskā izmeklēšana: visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes, ieskaitot iegarenās smadzenes/tiltu, smadzenīšu garozu un smadzeņu garozu, hipofīze, vairogdziedzeris/epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzera audi, (traheja), plaušas, sirds, aorta, siekalu dziedzeri, aknas, liesa, nieres, virsnieru dziedzeri, aizkuņģa dziedzeris, gonādas, dzemde (papildu dzimumorgāni), (āda), žultspūslis, barības vads, kuņģis, divpadsmitpirkstu zarna, tukšā zarna, līkumainā zarna, aklā zarna, lokzarna, taisnā zarna, urīnpūslis, limfmezglu paraugi, (sievišķais piena dziedzeris), (augšstilba muskulatūra), perifērās nervu sistēmas nervi, (acis), krūškauls ar kaula smadzenēm, (augšstilba kauls ar locītavas virsmu) un (triju līmeņu muguras smadzenes – no kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona). Iekavās iekļautie audi jāpārbauda tikai tad, ja novēro toksiskuma pazīmes vai viela iedarbojas tieši uz šo orgānu.

Histopatoloģiskā izmeklēšana

Vispusīga orgānu un audu histopatoloģiskā izmeklēšana veicama visiem kontroles dzīvniekiem un dzīvniekiem, kam ievadīta lielākā deva. Turpmāka histopatoloģiskā izmeklēšana citās dzīvnieku grupās skar orgānus, kuros novēroti bojājumi pēc lielās devas ievadīšanas, vai ja uz tādu vajadzību norāda klīniskie novērojumi.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājuma grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam novēroti bojājumi, bojājumu tipus un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katru bojājuma tipu. Iegūtie rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, šķirne vai līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,

— testa apstākļi,

— izmantotās devas (jānorāda arī šķīdinātājs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— toksiskās reakcijas atkarībā no dzimuma un devas,

— netoksiska deva, ja var noteikt,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums (īpaši ņem vērā klīnisko izmeklējumu rezultātus),

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,

— oftalmoloģijas dati,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,
— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti (arī urīnanalīzes rezultāti, ja tādi ir),
— autopsijas rezultāti,
— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,
— rezultātu statistiskā izvērtēšana, ja iespējams,
— rezultātu iztirzājums,
— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

SUBHRONISKĀS TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA PĒC ĀRĪGAS APLIKĀCIJAS

ATKĀRTOTA ĀRĪGA APLIKĀCIJA GRAUZĒJIEM (90 DIENAS)

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcijas**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Pārbaudāmo vielu dažādās devās katru dienu 90 dienu laikā uztriepj uz ādas izmēģinājumu dzīvniekiem, kas sadalīti vairākās grupās, un vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu. Aplikācijas laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Dzīvniekus, kas miruši izmēģinājuma laikā, secē un, beidzoties izmēģinājumam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus, jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Neilgi pirms izmēģinājuma dzīvniekiem uz muguras nocērp apmatojumu. Ādu var arī noskūt, bet tas jādara 24 stundas pirms izmēģinājuma. Parasti ik pēc nedēļas cirpšanu vai skūšanu atkārto. Cērpot vai skujot apmatojumu, jāuzmanās, lai nenobrāztu ādu. Pārbaudāmās vielas aplikācijai jāsagatavo ne mazāk kā 10 % no ķermeņa virsmas. Lemjot par to, cik lielai ādas virsmai jābūt brīvai no apmatojuma, lai to apstrādātu ar vielu, ņem vērā dzīvnieku svaru. Pārbaudot cietas vielas, kuras vajadzības gadījumā var saberzt pulverī, pārbaudāmā viela jāsamitrina ar pietiekamu daudzumu ūdens vai, ja nepieciešams, ar piemērotu šķīdinātāju, lai tai būtu laba saskare ar ādu. Šķidrumus parasti pārbauda neatšķaidītā vaidā. Parasti aplikāciju veic vienreiz dienā 5 līdz 7 dienas nedēļā.

Testa apstākļi

Izmēģinājumu dzīvnieki

Var izmantot pieaugušas žurkas, trušus vai jūrascūciņas. Var izmantot arī citas sugas dzīvniekus, bet tad šī izvēle ir jāpamato. Uzsākot izmēģinājumu, svara svārstību diapazonam jābūt ± 20 % no vidējā svara. Ja subhroniskās toksicitātes testu, izmantojot ārīgu aplikāciju, veic pirms ilglaicīga testa, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas un līnijas dzīvnieki.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Vienu un to pašu devu izmēģina vismaz uz 20 (10 sieviešu un 10 vīriešu kārtas) dzīvniekiem ar veselu ādu. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī izmēģinājuma laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nokauti izmēģinājuma gaitā. Bez tam var izveidot papildu grupu no 20 dzīvniekiem (pa 10 no katra dzimuma), kas 90 dienas saņem lielāko devu, un 28 dienu laikā pēc aplikācijas novēro, vai toksiskie simptomi ir atgriezeniski, noturīgi vai novēloti.

Izmantotās devas

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, kā arī jābūt kontroles grupai un, ja lieto šķīdinātāju, jābūt vēl vienai kontroles grupai, kurā dzīvnieki saņem tikai šķīdinātāju. Ekspozīcijas laiks ir vismaz 6 stundas dienā. Pārbaudāmās vielas aplikāciju katru dienu veic vienādā laikā, un vajadzīgais vielas daudzums ik pa laikam jāpielāgo (ik pēc nedēļas vai divām nedēļām), lai tās deva būtu nemainīga attiecībā pret dzīvnieku ķermeņa svaru. Ar kontroles grupas dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat, kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem pārbaudāmo vielu. Ja izmanto šķīdinātāju, kas atvieglo pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, kontroles dzīvnieki saņem tādu pašu daudzumu šķīdinātāja, kā dzīvnieki, kas saņem lielāko vielas devu. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska, bet kas neizraisa vai reti izraisa dzīvnieku nāvi. Vielas mazākā deva nedrīkst būt toksiska. Ja ir pieejami aptuveni dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielās devas toksiskums izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla devas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai. To dzīvnieku grupās, kas saņem mazo un vidēji lielo devu, jābūt zemam mirstības līmenim, lai varētu statistiski izvērtēt rezultātus.

Ja pārbaudāmās vielas aplikācija izraisa smagu ādas iekaisumu, tās koncentrācija jāsamazina, un tādēļ var samazināties vai neizpausties citi toksicitātes simptomi, lietojot lielo devu. Ja ādai ir nopietni bojājumi, var gadīties, ka izmēģinājums ir jāpārtrauc, un jauna pārbaude jāveic ar mazāku koncentrāciju.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Ja sākotnējā pārbaudē izmanto 1 000 mg/kg devu vai pat lielāku devu, kas atbilst devai, ar kādu parasti saskaras cilvēki (ja tā ir zināma), un tai nenovēro toksisku iedarbību, var uzskatīt, ka turpmāka testēšana nav nepieciešama.

Novērošanas periods

Izmēģinājumu dzīvniekiem katru dienu pārbauda toksiskuma pazīmes. Tiem reģistrē nāves iestāšanās brīdi, kā arī laiku, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

Testa norise

Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī. Dzīvniekus parasti apstrādā ar pārbaudāmo vielu 7 dienas nedēļā 90 dienu laikā.

Dzīvnieki papildu grupās, kas paredzētas tālākai novērošanai, turpmākās 28 dienas nesaņem pārbaudāmo vielu, lai varētu izsekot, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā iedarbība. Ekspozīcijas ilgums ir vismaz 6 stundas dienā.

Pārbaudāmā viela vienmērīgi jāuztriepj uz ādas virsmas, kas veido aptuveni 10 % no kopējās ķermeņa virsmas. Ja vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamo ādas virsmu var samazināt, bet tai vienalga jābūt pēc iespējas lielākai, un viela jāuztriepj cik iespējams plānāk un vienmērīgāk.

Pārbaudāmās vielas saskari ar ādu ekspozīcijas laikā nodrošina ar poraina marles pārsēja un nekairinoša plākstera palīdzību. Apstrādātā vieta vēl papildus pienācīgi jāpārklāj, lai nostiprinātu marles pārsēju ar pārbaudāmo vielu un lai dzīvnieki nevarētu norīt pārbaudāmo vielu. Lai pārbaudāmā viela nenonāktu barības vadā, var daļēji ierobežot dzīvnieku kustību, taču pilnīga imobilizācija nebūtu vēlama.

Beidzoties ekspozīcijas laikam, pārbaudāmās vielas atlikums no ādas jānoņem, ja iespējams, izmantojot ūdeni vai citu piemērotu ādas mazgāšanas līdzekli.

Dzīvniekus katru dienu novēro, reģistrējot toksiskuma pazīmes, kā arī to parādīšanās brīdi, pakāpi un ilgumu. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas Katru nedēļu jānosaka barības patēriņš, un katru nedēļu dzīvnieki jānosver. Pastāvīga dzīvnieku novērošana ļauj novērst dzīvnieku zudumus izmēģinājuma laikā kanibālisma, audu autolīzes vai nepareizu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties izmēģinājumam, visus izdzīvojušos dzīvniekus, izņemot papildu grupas dzīvniekus, secē. Pamanot mirstošus dzīvniekus, tos uzreiz nošķir no pārējiem un secē.

Visus dzīvniekus, tostarp arī kontroles dzīvniekus, parasti pakļauj šādām pārbaudēm:

a) Pirms pārbaudāmās vielas aplikācijas un testa beigās jāveic ja ne visu dzīvnieku, tad vismaz to, kas ir saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvnieku oftalmoloģiskā izmeklēšana, izmantojot oftalmoskopu vai piemērotu līdzvērtīgu aparātu. Ja novēro izmaiņas acīs, ir jāpārbauda visi dzīvnieki.

b) Beidzoties izmēģinājumam, jāveic hematoloģiskā izmeklēšana, kas ietver hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocītu formulas, kā arī asins recēšanas spēju, piemēram, recēšanas laika, protrombīna laika, tromboplastīna laika vai trombocītu skaita noteikšanu.

c) Beidzoties izmēģinājumam, jāveic arī asins klīniskās bioķīmijas izmeklējumi. Šie izmeklējumi visos gadījumos attiecas uz elektrolītu sastāvu, ogļhidrātu metabolismu, aknu un nieru darbību. Atsevišķu analīžu izvēle ir atkarīga no konkrētās vielas iedarbības veida. Ieteiktās analīzes ietver kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, glikozes pēc badošanās (badošanās ilgums ir atkarīgs no dzīvnieku sugas), seruma glutamātpiruvāttransamināzes ([1]), seruma glutamātoksalacetāttransamināzes ([2]), ornitīndekarboksilāzes, *gamma*-glutamiltranspeptidāzes, urīnvielas slāpekļa, albumīna, plazmas kreatinīna, kopējā bilirubīna un kopējo seruma olbaltumvielu noteikšanu.

Citas analīzes, kas jāveic, lai gūtu vispusīgu toksikoloģisko novērtējumu, paredz lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu. Vajadzības gadījumā var veikt arī citus klīniskās bioķīmijas izmeklējumus, lai padziļināti izpētītu vielas iedarbību.

d) Urīnanalīze parasti nav jāveic, ja vien nepastāv varbūtība, ka viela var būt toksiska, vai to apstiprina novērojumi.

Ja agrāk iegūtie dati ir nepietiekami, pirms uzsākt izmēģinājumu, jāapsver iespēja jau iepriekš noteikt hematoloģiskos un klīniskās bioķīmijas rādītājus.

Autopsija

Visiem dzīvniekiem veic pilnu autopsiju, kas paredz ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru, kā arī galvaskausa, krūškurvja un vēdera dobuma un to satura apskati. Aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši. Piemērotā vidē jāsaglabā šādi orgāni un audi, lai turpmāk būtu iespējama to histopatoloģiskā izmeklēšana: visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes, ieskaitot iegarenās smadzenes/tiltu, smadzenīšu garozu un smadzeņu garozu, hipofīze, vairogdziedzeris/epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzera audi, (traheja), plaušas, sirds, aorta, siekalu dziedzeri, aknas, liesa, nieres, virsnieru dziedzeri, aizkuņģa dziedzeris, gonādas, dzemde, papildu dzimumorgāni, žultspūslis (ja ir), barības vads, kuņģis, divpadsmitpirkstu zarna, tukšā zarna, līkumainā zarna, aklā zarna, lokzarna, taisnā zarna, urīnpūslis, limfmezglu paraugi, (sievišķais piena dziedzeris), (augšstilba muskulatūra), perifērās nervu sistēmas nervi, (acis), (krūšu kauls ar kaula smadzenēm), (augšstilba kauls ar locītavas virsmu), (triju līmeņu muguras smadzenes – no kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona) un (ārpusorbītas asaru dziedzeri). Iekavās iekļautie audi jāpārbauda tikai tad, ja novēro toksiskuma pazīmes vai viela iedarbojas tieši uz šo orgānu.

Histopatoloģiskā izmeklēšana

a) Vispusīgu normālas un apstrādātas ādas, orgānu un audu histopatoloģisko izmeklēšanu veic visiem kontroles dzīvniekiem un dzīvniekiem, kas ir saņēmuši lielāko devu.

b) Jāizpēta visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem.

c) Jāizpēta iedarbības skartie orgāni arī pārējās dzīvnieku grupās.

d) Ja izmanto žurkas, histopatoloģiski jāizmeklē infekcijas klātbūtne dzīvnieku plaušās pēc mazās un vidēji lielās devas aplikācijas, jo šādi var ērti novērtēt dzīvnieku veselības stāvokli. Turpmāko histopatoloģisko izmeklēšanu šajās dzīvnieku grupās parasti neveic, bet to obligāti veic dzīvniekiem pēc lielās devas aplikācijas, un tā attiecas uz orgāniem, kuriem ir novēroti bojājumi.

e) Ja izmanto papildu grupu, histopatoloģiski jāizmeklē audi un orgāni, uz kuriem iedarbojas pārbaudāmā viela pēc aplikācijas pārējās grupās.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam novēroti bojājumi, bojājumu tipus un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katru bojājuma tipu. Iegūtie rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

([1]) Pašreizējais nosaukums – seruma alanīnaminotransferāze.
([2]) Pašreizējais nosaukums – seruma aspartātaminotransferāze.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,
— testa apstākļi,
— izmantotās devas (jānorāda arī šķīdinātājs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,
— toksiskās reakcijas atkarībā no dzimuma un devas,
— netoksiska deva, ja var noteikt,
— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,
— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,
— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,
— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,
— oftalmoloģijas dati,
— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,
— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti (arī urīnanalīzes rezultāti, ja tādi ir),
— autopsijas rezultāti,
— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,
— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,
— rezultātu iztirzājums,
— rezultātu interpretācija.

3.2. Izvērtējums un interpretācija

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

SUBHRONISKĀS TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA PĒC INHALĀCIJAS

TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA GRAUZĒJIEM PĒC ATKĀRTOTAS INHALĀCIJAS (90 DIENAS)

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcijas

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Vairākas izmēģinājumu dzīvnieku grupas katru dienu noteiktā laika posmā pakļauj dažādu pārbaudāmās vielas koncentrāciju iedarbībai, kopumā 90 dienu garumā; vienas grupas dzīvnieki saņem vielu vienādā koncentrācijā. Ja lieto nesējvielu, kas palīdz iegūt vajadzīgu pārbaudāmās vielas koncentrāciju atmosfērā, jābūt kontroles grupai, kas saņem tikai nesējvielu. Ekspozīcijas laikā dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes. Testa laikā mirušos dzīvniekus secē un, beidzoties testam, secē arī izdzīvojušos dzīvniekus.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Vismaz piecas dienas iepriekš dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus, jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Ja nepieciešams, pārbaudāmajai vielai var pievienot piemērotu šķīdinātāju, kas palīdz iegūt atbilstošu vielas koncentrāciju atmosfērā. Ja izmanto šķīdinātāju vai citas piedevas, kas atvieglo pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, ir jāpārliecinās, ka tās nav toksiskas. Vajadzības gadījumā var izmantot agrāk iegūtus datus.

Testa apstākļi

Izmēģinājumu dzīvnieki

Ja nav kontrindikāciju, vēlams izmantot žurkas. Jāizmanto jauni un veseli dzīvnieki, kas pieder pie plaši izplatītajām laboratorijas dzīvnieku līnijām. Uzsākot izmēģinājumus, dzīvnieku ķermeņa svara svārstību diapazons nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara. Ja subhroniskās toksicitātes testu pēc inhalācijas veic pirms ilglaicīga testa, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas un līnijas dzīvnieki.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Ekspozīcijas laikā vienu un to pašu devu saņem vismaz 20 dzīvnieki (10 mātītes un 10 tēviņi). Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī izmēģinājuma laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nokauti izmēģinājumu gaitā. Bez tam var izveidot papildu grupu no 20 dzīvniekiem (pa 10 no katra dzimuma), kas 90 dienas saņem lielāko koncentrāciju, un 28 dienu laikā pēc inhalācijas novēro, vai toksiskā iedarbība ir atgriezeniska, noturīga vai novēlota.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Jāizmanto vismaz trīs dažādas koncentrācijas, kā arī jābūt kontroles grupai, bet ja izmanto nesējvielu, jābūt arī kontroles dzīvniekiem, kas saņem tikai nesējvielu tās lielākajā koncentrācijā. Ar kontroles dzīvniekiem rīkojas tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem pārbaudāmo vielu. Jāizvēlas tāda lielākā koncentrācija, kas ir toksiska, bet kas neizraisa vai reti izraisa dzīvnieku nāvi. Ja ir pieejami aptuveni dati par to, ar kādām devām saskaras cilvēki, vismazākajai devai jābūt lielākai par tām. Būtu vēlams, ka vidēji lielās koncentrācijas toksicitāte izpaužas minimāli. Ja izmanto vairākas vidējā intervāla koncentrācijas, to toksiskajai iedarbībai jābūt manāmi atšķirīgai. Dzīvnieku grupās, kas saņem mazo un vidēji lielo devu, jābūt zemam mirstības līmenim, lai varētu statistiski izvērtēt rezultātus.

Ekspozīcijas ilgums

Katru dienu ekspozīcijas ilgums pēc līdzsvara iestāšanās inhalācijas kamerā ir 6 stundas. Var būt arī cits ekspozīcijas ilgums atkarībā no konkrētām prasībām.

Aprīkojums

Izmēģinājumos ar dzīvniekiem izmanto inhalācijas iekārtas, kas nodrošina dinamisku gaisa plūsmu (vismaz 12 gaisa maiņas stundā), pietiekamu skābekļa koncentrāciju un vienmērīgu atmosfēru ekspozīcijas laikā. Ja izmanto inhalācijas kameru, tās konstrukcijai jābūt tādai, kas neļauj dzīvniekiem drūzmēties un maksimāli nodrošina pārbaudāmās vielas iedarbību ekspozīcijas laikā. Lai kamerā būtu noturīga atmosfēra, izmēģinājumu dzīvnieku kopējais "tilpums" parasti nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Var izmantot kameras, kas nodrošina dzīvnieku mutes un deguna, galvas vai visa ķermeņa saskari ar vielu; pirmajā un otrajā gadījumā samazinās iespēja uzņemt vielu citādā veidā, nevis ieelpojot.

Novērošanas periods

Visu ekspozīcijas un atveseļošanās laiku izmēģinājumu dzīvniekus katru dienu apskata un reģistrē toksiskuma pazīmes. Tiem reģistrē nāves iestāšanās brīdi, kā arī laiku, kad parādās vai izzūd toksiskuma pazīmes.

Testa norise

Dzīvniekus 90 dienu laikā katru dienu, 5-7 dienas nedēļā, pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai. Dzīvnieki papildu grupās, kas paredzētas tālākai novērošanai, turpmākās 28 dienas nesaņem pārbaudāmo vielu, lai varētu izsekot, kā tie atveseļojas un cik ilgi saglabājas toksiskā iedarbība. Izmēģinājuma laikā jānodrošina 22 ± 3 °C temperatūra. Parasti jānodrošina 30-70 % relatīvais mitrums, lai gan atsevišķos gadījumos (piem., ja izmanto aerosolus) to nevar panākt. Ekspozīcijas laikā dzīvniekus nebaro un nedzirda.

Jāizmanto dinamiskā inhalācijas sistēma, kas nodrošina pienācīgu koncentrācijas kontroli. Lai noteiktu vajadzīgo pārbaudāmās vielas koncentrāciju, iesaka veikt priekšizpēti. Gaisa plūsma jānoregulē tā, lai visā inhalācijas kamerā būtu nodrošināti vienādi apstākļi. Sistēmai pēc iespējas ātrāk jānodrošina nemainīgi ekspozīcijas apstākļi.

Jāveic šādu parametru mērījumi un uzraudzība:

a) gaisa plūsmas ātrums (nepārtraukti);

b) pārbaudāmās vielas faktiskā koncentrācija inhalācijas zonā. Vielas koncentrācijas svārstības ekspozīcijas laikā nedrīkst pārsniegt ± 15 % no vidējās vērtības. Tomēr, ja izmanto putekļus un aerosolus, to nevar tik viegli panākt, un tad ir pieļaujams plašāks svārstību diapazons. Visā izmēģinājuma laikā katru dienu pēc iespējas jācenšas nodrošināt nemainīgu vielas koncentrāciju. Gatavojoties izmēģinājumam, jāveic daļiņu lieluma analīze, lai noteiktu aerosola koncentrācijas noturīgumu. Šī analīze ekspozīcijas laikā jāveic pēc iespējas biežāk, lai pārliecinātos, ka daļiņu sadalījums pēc lieluma paliek nemainīgs;

c) temperatūra un gaisa mitrums;

d) ekspozīcijas laikā un pēc tam regulāri veic novērojumus un tos reģistrē; jābūt atsevišķiem pierakstiem par katru dzīvnieku. Dzīvniekus novēro katru dienu, reģistrējot toksiskuma pazīmes, kā arī to parādīšanās brīdi, pakāpi un ilgumu. Novērojot dzīvniekus, jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar ādu, acis, gļotādas, elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Katru nedēļu jānosaka barības patēriņš, un katru nedēļu dzīvnieki jānosver. Sistemātiska dzīvnieku novērošana ļauj novērst dzīvnieku zudumus izmēģinājuma laikā kanibālisma, audu autolīzes vai nepareizu turēšanas apstākļu dēļ. Beidzoties ekspozīcijas laikam, visus izdzīvojušos dzīvniekus secē. Pamanot mirstošus dzīvniekus, tos uzreiz nošķir no pārējiem un secē.

Visus dzīvniekus, arī kontroles dzīvniekus, parasti pakļauj šādām pārbaudēm:

a) pirms pārbaudāmās vielas aplikācijas un izmēģinājuma beigās jāveic ja ne visu dzīvnieku, tad vismaz to, kas saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvnieku oftalmoloģiskā izmeklēšana, izmantojot oftalmoskopu vai piemērotu līdzvērtīgu aparātu. Ja novēro izmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki;

b) beidzoties izmēģinājumam, ir jāveic hematoloģiskā izmeklēšana, kas ietver hematokrīta, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaita, leikocītu skaita un leikocītu formulas, kā arī asins recēšanas spēju, piemēram, recēšanas laika, protrombīna laika, tromboplastīna laika vai trombocītu skaita noteikšanu;

c) beidzoties izmēģinājumam, ir jāveic arī asins klīniskās bioķīmijas izmeklējumi. Šie izmeklējumi visos gadījumos attiecas uz elektrolītu sastāvu, ogļhidrātu metabolismu, aknu un nieru darbību. Atsevišķu analīžu izvēle ir atkarīga no konkrētās vielas iedarbības veida. Ieteiktās analīzes ietver kalcija, fosfora, hlorīdu, nātrija, kālija, glikozes pēc badošanās (badošanās ilgums ir atkarīgs no dzīvnieku sugas), seruma glutamāt-piruvāttransamināzes ([1]), seruma glutamātoksalacetāttransamināzes ([2]), ornitīndekarboksilāzes, *gamma*-glutamiltranspeptidāzes, urīnvielas slāpekļa, albumīna, plazmas kreatinīna, kopējā bilirubīna un kopējo seruma olbaltumvielu noteikšanu. Citas analīzes, kas jāveic, lai gūtu vispusīgu toksikoloģisko novērtējumu, paredz lipīdu, hormonu, skābju/bāzu līdzsvara, methemoglobīna un holīnesterāzes aktivitātes noteikšanu. Vajadzības gadījumā var veikt arī citas klīniskās bioķīmijas analīzes, lai padziļināti izpētītu vielas iedarbību;

d) urīnanalīze parasti nav jāveic, ja vien nepastāv varbūtība, ka viela var būt toksiska, vai to apstiprina novērojumi.

Ja agrāk iegūtie dati ir nepietiekami, pirms uzsākt izmēģinājumu, jāapsver iespēja jau iepriekš noteikt hematoloģiskos un klīniskās bioķīmijas rādītājus.

Autopsija

Visiem dzīvniekiem veic pilnu autopsiju, kas paredz ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru, kā arī galvaskausa, krūškurvja un vēdera dobumu un to satura apskati. Aknas, nieres, virsnieru dziedzerus un sēkliniekus nosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši. Piemērotā vidē jāsaglabā šādi orgāni un audi, lai turpmāk būtu iespējama to histopatoloģiskā izmeklēšana: visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem, plaušas, kas jāizņem saudzīgi un pilnībā, jānosver un jāapstrādā ar piemērotu fiksatoru, šādi nodrošinot plaušu struktūras saglabāšanu (uzskata, ka plaušu perfūzija ar fiksatoru ir noderīgs paņēmiens), smadzenes, ieskaitot iegarenās smadzenes/tiltu, smadzenīšu garozu un smadzeņu garozu, hipofīze, vairogdziedzeris/epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzera audi, traheja, sirds, aorta, siekalu dziedzeri, aknas, liesa, nieres, virsnieru dziedzeri, aizkuņģa dziedzeris, gonādas, dzemde (papildu dzimumorgāni), (āda), žultspūslis (ja ir), barības vads, kuņģis, divpadsmitpirkstu zarna, tukšā zarna, līkumainā zarna, aklā zarna, lokzarna, taisnā zarna, urīnpūslis, limfmezglu paraugi, (sievišķais piena dziedzeris), (augšstilba muskulatūra), perifērās nervu sistēmas nervi, (acis), krūšu kauls ar kaula smadzenēm, (augšstilba kauls ar locītavas virsmu) un (triju līmeņu muguras smadzenes – no kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona). Iekavās iekļautie audi jāpārbauda tikai tad, ja novēro toksiskuma pazīmes vai viela iedarbojas tieši uz šo orgānu.

Histopatoloģiskā izmeklēšana

a) Vispusīgu elpošanas orgānu un citu orgānu un audu histopatoloģisko izmeklēšanu veic visiem kontroles dzīvniekiem un dzīvniekiem, kas saņēmuši lielāko devu.

b) Jāizpēta visi orgāni ar makroskopiskiem bojājumiem.

c) Jāizpēta iedarbības skartie orgāni arī pārējās dzīvnieku grupās.

d) Histopatoloģiski jāizmeklē dzīvnieku plaušas pēc mazās un vidēji lielās devas aplikācijas, jo šādi var ērti novērtēt dzīvnieku veselības stāvokli. Turpmāko histopatoloģisko izmeklēšanu šo grupu dzīvniekiem parasti neveic, bet to obligāti veic dzīvniekiem pēc lielās devas aplikācijas, un tā attiecas uz orgāniem, kuriem ir novēroti bojājumi.

e) Ja izmanto papildu grupu, histopatoloģiski jāizmeklē audi un orgāni, uz kuriem iedarbojas pārbaudāmā viela, par ko liecina novērojumi citās dzīvnieku grupās.

([1]) Pašreizējais nosaukums – seruma alanīnaminotransferāze.
([2]) Pašreizējais nosaukums – seruma aspartātaminotransferāze.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam ir novēroti bojājumi, bojājumu tipus un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katru bojājuma tipu. Iegūtie rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,

— testa apstākļi:

inhalācijas iekārtas apraksts, norādot tās konstrukciju, modeli, izmērus, gaisa avotu, makrodaļiņu un aerosolu ģenerēšanas sistēmu, gaisa kondicionēšanas paņēmienu, izplūdes gaisa apstrādi un dzīvnieku turēšanas apstākļus izmēģinājumu kamerā, ja tādu izmanto. Jāapraksta ierīces temperatūras, gaisa mitruma un, vajadzības gadījumā, aerosolu koncentrācijas noturīguma vai daļiņu lieluma noteikšanai;

ekspozīcijas parametri, kas jāapkopo tabulā, norādot vidējās vērtības, kā arī svārstību diapazonu (piem., standartnovirzi) un minot arī:

a) gaisa plūsmas ātrumu inhalācijas iekārtā;

b) gaisa temperatūru un mitrumu;

c) nominālo koncentrāciju (inhalācijas iekārtā ievadītais pārbaudāmās vielas kopējais daudzums, kas izdalīts ar gaisa daudzumu);

d) nesējvielas tipu, jā tādu izmanto;

e) faktisko vielas koncentrāciju inhalācijas zonā;

f) daļiņu vidējo lielumu (vajadzības gadījumā),

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un koncentrācijas,

— netoksiska deva, ja var noteikt,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,

— oftalmoloģijas dati,

— veiktie hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti (arī urīnanalīzes rezultāti, ja tādi ir),

— autopsijas rezultāti,

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

TERATOGENITĀTES NOTEIKŠANA GRAUZĒJIEM UN CITU SUGU DZĪVNIEKIEM

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcijas

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Pārbaudāmo vielu dažādās devās vai koncentrācijās izmēģinājuma laikā ievada vairākām grūsnu mātīšu grupām tā, lai tas sakrīt ar grūtniecības posmu, kurā notiek organoģenēze; vienas grupas dzīvnieki saņem vienādu devu Grūsno mātīti īsi pirms paredzamās atnešanās nokauj, izņem dzemdi un pārbauda tās saturu. Ar šo metodi nosaka embrionālo toksicitāti un fetotoksicitāti.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Līdzīga vecuma un lieluma veselas un jaunas neapaugļotas mātītes vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma pieradina pie laboratorijas apstākļiem un pēc tam tās sapāro ar vaislīgiem tēviņiem. Apsēklotas mātītes pēc nejaušības principa sadala apstrādes grupās.

Pārošanās var noritēt dabīgā veidā, bet var izmantot arī mākslīgo apsēklošanu. Pārbaudāmo vielu mātītes saņem katru dienu visu organoģenēzes laiku, sākot no implantācijas. Dienu pirms atnešanās augļus izņem, veicot histerektomiju, un reģistrē iekšējo orgānu vai skeleta anomālijas, tostarp augšanas nomākšanu, novēlotu osifikāciju un hemorāģijas.

Testa apstākļi

Izmēģinājumu dzīvnieki

Šim nolūkam parasti izmanto žurkas, peles, kāmjus un trušus. Tomēr vēlams izmantot žurkas un trušus. Jāizmanto dzīvnieki, kas pieder pie plaši izplatītām laboratorijas dzīvnieku līnijām. Izvēlētās līnijas dzīvniekiem jābūt vaislīgiem un uzņēmīgiem pret teratogēniem. Katru dzīvnieku tur atsevišķā būrī.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Katru devu pārbauda vismaz uz 20 grūsnām žurkām, pelēm vai kāmju mātītēm, vai uz 12 grūsnām trušu mātītēm. Šādi tiek nodrošināts pietiekams metienu un mazuļu daudzums, lai varētu novērtēt pārbaudāmās vielas teratogenitāti.

Izmantotās devas

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, un jābūt kontroles grupai. Ja pārbaudāmo vielu ievada kopā ar šķīdinātāju, ir jābūt kontroles grupai, kurā dzīvnieki saņem tikai šķīdinātāju. Jāizmanto šķīdinātājs ar labi zināmām toksiskām īpašībām; tas nedrīkst iedarboties kā teratogēns vai ietekmēt reproduktīvo funkciju. Ar kontroles grupas(-u) dzīvniekiem rīkojas tāpat kā ar pārējiem dzīvniekiem, tie tikai nesaņem pārbaudāmo vielu.

Ja pārbaudāmās vielas fizikālās/ķīmiskās vai bioloģiskās īpašības to pieļauj, jāizvēlas tāda lielākā deva, kas mātītes organismā izraisa redzamas saindēšanās pazīmes, piemēram, nelielu svara zudumu, bet neizraisa vairāk kā 10 % dzīvnieku mirstību. Pārbaudāmās vielas mazākā deva nedrīkst izraisīt redzamus simptomus. Vidēji lielā(s) deva(s), kas atrodas starp maksimālo un minimālo devu, jāizvēlas pēc ģeometriskā principa.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Ja maztoksiska viela, kuras deva ir vismaz 1000 mg/kg, neuzrāda embriotoksicitāti vai teratogenitāti, tās tālākā pārbaude, izmantojot citas devas, nav vajadzīga.

Ekspozīcijas laiks

Izmēģinājuma laikā dienu skaitīšanu sāk no dienas, kad makstī novēro korķi un/vai spermu (ja iespējams to pārbaudīt). Jāizvēlas tāds ekspozīcijas laiks, kas aptver gandrīz visu organoģenēzi. Žurkām un pelēm tas var ilgt no 6. līdz 15. dienai, kāmjiem – no 6. līdz 14. dienai, bet trušiem – no 6. līdz 18. dienai. Ja sākumpunktu nosaka, pamatojoties uz pārošanās novērojumiem vai uz mākslīgo apsēklošanu, pārējos termiņus koriģē, pievienojot tiem pa vienai dienai. Pastāv arī iespēja ekspozīcijas laiku pagarināt līdz vienai dienai pirms paredzamās atnešanās.

Novērošanas periods

Vismaz vienreiz dienā jāveic rūpīga klīniskā pārbaude. Bez tam dzīvniekus katru dienu novēro un gādā par to, lai samazinātu to zudumus izmēģinājuma laikā.

Testa norise

Pārbaudāmo vielu ievada perorāli vai ar zondes palīdzību. Pārbaudāmo vielu katru dienu ievada pēc iespējas vienādā laikā.

Sieviešu kārtas dzīvnieki visu izmēģinājuma laiku ik dienas saņem pārbaudāmo vielu. Vajadzīgo devu var izvēlēties pēc mātīšu svara brīdī, kad sākas pārbaudāmās vielas aplikācija, vai arī, ņemot vērā straujo svara pieaugumu grūtniecības laikā, dzīvniekus regulāri nosver un vielas devu nosaka pēc kārtējās svēršanas. Toksiskuma pazīmes reģistrē uzreiz pēc atklāšanas, norādot to parādīšanās brīdi, smaguma pakāpi un ilgumu. Mātītes, kurām novēro grūtniecības pārtrūkšanas vai priekšlaicīgas atnešanās pazīmes, jānokauj un jāpakļauj rūpīgai makroskopiskai apskatei. Dzīvnieku novērošanu pēc vielas aplikācijas turpina pat līdz pēdējai dienai pirms atnešanās termiņa; šādi var nodrošināt novērošanu gandrīz visu grūtniecības laiku, gādājot par to, lai netiktu apgrūtināta rezultātu interpretācija, mazuļiem piedzimstot dabīgā ceļā. Novērojot dzīvniekus, galvenā uzmanība jāpievērš izmaiņām, kas skar ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas. Katru nedēļu jānosaka barības patēriņš. Tāpat dzīvnieki katru nedēļu jānosver.

Autopsija

Katru mātīti, kas mirusi izmēģinājuma laikā vai tūlīt pēc tā beigām, jāapskata makroskopiski, reģistrējot visas anomālijas vai patoloģiskās izmaiņas, kuras būtu varējušas ietekmēt grūtniecības gaitu. Uzreiz pēc nāves iestāšanās jāizņem dzemde un jāpārbauda tās saturs, reģistrējot nedzīvu embriju vai augļu, kā arī dzīvu augļu skaitu. Parasti ir iespējams aptuveni noteikt augļu bojāejas brīdi dzemdē. Žurku un trušu mātītēm var noteikt dzelteno ķermeņu skaitu olnīcās. Jānosaka augļu dzimums, katru augli nosver un reģistrē tā svaru, kā arī aprēķina vidējo svaru. Pēc augļu izņemšanas tiem veic ārēju apskati. Vienu trešdaļu vai pusi no katra žurku, peļu un kāmju metiena preparē un reģistrē skeleta anomālijas, pārējo metiena daļu preparē un pārbauda mīksto audu anomālijas, izmantojot attiecīgās metodes. Katru truša augli rūpīgi secē un reģistrē iekšējo orgānu un skeleta anomālijas.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, grūsno matīšu skaitu, dzīvo augļu, kā arī tādu augļu skaitu un procentuālo īpatsvaru, kam novērotas mīksto audu vai skeleta anomālijas, un to attiecību katrā metienā. Rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,
— testa apstākļi,
— izmantotās devas (jānorāda arī šķīdinātājs, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,
— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no devas,
— netoksiska deva, ja var noteikt,
— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,
— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,
— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,
— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,
— grūtniecības ilgums un dati par metienu (arī agrāk iegūtie dati),
— dati par augļiem (dzīvie/nedzīvie, dzimums, mīksto audu un skeleta defekti),
— dati par metienu (dzīvie/nedzīvie, dzimums, mīksto audu un skeleta defekti katrā metienā),
— rezultātu statistiskā apstrāde,
— rezultātu iztirzājums,
— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

HRONISKĀS TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcijas

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Izmantojot attiecīgo aplikācijas veidu, pārbaudāmo vielu parasti ievada septiņas dienas nedēļā vairākām izmēģinājumu dzīvnieku grupām; katra grupa saņem vienādu devu, un ekspozīcijas laiks aptver ievērojamu mūža daļu. Pārbaudāmās vielas ekspozīcijas laikā un pēc tam izmēģinājumu dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus, jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās.

Testa apstākļi

Izmēģinājumu dzīvnieki

Šim nolūkam ieteicams izmantot žurkas. Atkarībā no iepriekš veikto pētījumu rezultātiem var izmantot arī citu sugu dzīvniekus (ne tikai grauzējus). Izmanto jaunus un veselus dzīvniekus, kas pieder pie plaši izplatītām laboratorijas dzīvnieku līnijām, un vielu sāk ievadīt uzreiz pēc atšķiršanas.

Uzsākot izmēģinājumus, dzīvnieku ķermeņa svara svārstības nedrīkst būt lielākas par ± 20 % no vidējā svara. Ja subhroniskās toksicitātes noteikšanu pēc perorālas aplikācijas veic pirms ilglaicīga testa, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas/šķirnes un līnijas dzīvnieki.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Ja izmanto grauzējus, vienu un to pašu devu ievada vismaz 40 dzīvniekiem (20 mātītēm un 20 tēviņiem), vienlaikus jābūt arī kontroles grupai. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī izmēģinājuma laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nokauti izmēģinājuma gaitā.

Ja izmantotie dzīvnieki nav grauzēji, ir pieļaujams mazāks dzīvnieku skaits, bet tāpat katrā grupā jābūt vismaz pa četriem katra dzimuma īpatņiem.

Izmantotās devas un aplikācijas biežums

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, un vienlaikus jābūt kontroles grupai. Vielas lielākajai devai jābūt izteikti toksiskai, neizraisot pārmērīgi augstu mirstību. Viela vismazākajā devā nedrīkst būt toksiska.

Vidēji lielo devu(-as) izvēlas pa vidu starp lielo un mazo devu.

Izvēloties šīs devas, jāņem vērā iepriekšējo toksicitātes testu un pētījumu rezultāti.

Parasti pārbaudāmo vielu ievada katru dienu. Ja vielu pievieno dzeramajam ūdenim vai uzturam, tai visu laiku jābūt pieejamai dzīvniekiem.

Kontroles dzīvnieki

Vienlaikus jābūt kontroles dzīvniekiem, kas no pārējiem dzīvniekiem atšķiras tikai ar to, ka tie nesaņem pārbaudāmo vielu.

Atsevišķos gadījumos, piemēram, pēc aerosolu inhalācijas vai pēc perorālas aplikācijas, kad izmanto emulgatoru, kura bioloģiskā iedarbība nav zināma, vienlaikus jāizmanto negatīvā kontroles grupa. Negatīvās kontroles grupa atšķiras no pārējām grupām tikai ar to, ka šie dzīvnieki nesaņem pārbaudāmo vielu vai šķīdinātāju/nesējvielu.

Ievadīšanas veids

Divi galvenie ievadīšanas veidi ir perorāla aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas veida izvēle ir atkarīga no pārbaudāmās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā veidā cilvēki parasti nonāk saskarē ar šo vielu.

Ārīga aplikācija var radīt nopietnas grūtības no praktiskā viedokļa. Par vispārējo hronisko toksicitāti, vielai uzsūcoties caur ādu, parasti spriež pēc rezultātiem, kas gūti pēc perorālas ievadīšanas, un pēc tā, cik lielā mērā tā uzsūcas caur ādu, par ko liecina iepriekš veiktie toksicitātes testi, izmantojot ārīgu aplikāciju.

Perorāla aplikācija

Ja pārbaudāmā viela organismā nonāk caur kuņģa-zarnu traktu, un ja tieši tādā veidā tā var apdraudēt cilvēkus, ieteicams izmantot perorālu aplikāciju, ja tam nav kontrindikāciju.

Dzīvnieki var saņemt pārbaudāmo vielu kopā ar uzturu, dzeramo ūdeni vai kapsulās.

Dzīvnieki parasti saņem vielas devu katru dienu septiņas dienas nedēļā, jo, ja vielu ievada tikai piecas dienas nedēļā, "tukšajā laikā" dzīvnieki var atkopties, toksicitātes simptomi iet mazumā, kas savukārt ietekmēs rezultātus un to novērtēšanu. Tomēr, galvenokārt aiz praktiskiem apsvērumiem, uzskata, ka ir arī pieļaujama vielas ievadīšana piecas dienas nedēļā.

Inhalācijas tests

Tā kā, veicot inhalācijas testus, rodas lielākas tehniskas grūtības nekā tad, kad izmanto citus aplikācijas veidus, šeit sniegti sīkāki norādījumi attiecībā uz šo testu izmantošanu. Turklāt jāpiezīmē, ka atsevišķos gadījumos kā veiksmīgu alternatīvu var izmantot intratraheālu instilāciju.

Izvēloties ilglaicīgu ekspozīciju, parasti ņem vērā cilvēku iespējamo saskari ar vielu, tālab dzīvniekus katru dienu piecas reizes nedēļā uz sešām stundām ievieto inhalācijas kamerā ar vienmērīgu vielas koncentrāciju (periodiskā ekspozīcija) vai, ņemot vērā iespējamo vielas klātbūtni apkārtējā vidē, tos katru dienu 7 reizes nedēļā uz 22-24 stundām pakļauj vielas iedarbībai (nepārtrauktā ekspozīcija), katru dienu vienādā laikā paredzot vienu stundu dzīvnieku barošanai un inhalācijas kameras apkopšanai. Parasti abos gadījumos dzīvnieki saņem pārbaudāmo vielu noteiktā koncentrācijā. Galvenā atšķirība starp periodisko un nepārtraukto ekspozīciju ir tā, ka pirmajā gadījumā, beidzoties iedarbībai, dzīvnieki var atkopties 17-18 stundu laikā, un nedēļas nogalē šis atkopšanās laiks ir vēl garāks.

Periodiskās vai nepārtrauktās ekspozīcijas izvēle ir atkarīga no pētījuma mērķiem un no izvēlētā modeļa, kas simulē apstākļus, kādos cilvēki nonāk saskarē ar vielu. Šeit tomēr jārēķinās ar dažām tehniskām grūtībām. Piemēram, nepārtrauktās ekspozīcijas priekšrocības, modelējot apkārtējas vides apstākļus, var mazināt tas, ka ekspozīcijas laikā dzīvnieki jābaro un jāizmanto daudz sarežģītākas (un precīzākas) aerosola un tvaika ģenerēšanas un kontroles metodes.

Inhalācijas kameras

Izmēģinājumos ar dzīvniekiem izmanto inhalācijas kameras, kas nodrošina dinamisku gaisa plūsmu (vismaz 12 gaisa maiņas stundā), pietiekamu skābekļa koncentrāciju un vienmērīgu atmosfēru ekspozīcijas laikā. Kontroles un izmēģinājumu dzīvniekiem izmanto vienādas uzbūves un konstrukcijas inhalācijas kameras, kas nodrošina līdzvērtīgus ekspozīcijas apstākļus, izņemot pārbaudāmās vielas klātbūtni. Gaisa spiediens kamerā parasti ir nedaudz pazemināts, lai izvairītos no pārbaudāmās vielas izplūšanas apkārtējā vidē. Kamerās jābūt pietiekami daudz vietas izmēģinājumu dzīvniekiem. Parasti, lai kamerā būtu noturīga atmosfēra, izmēģinājumu dzīvnieku kopējais "tilpums" nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma.

Jāveic šādu parametru mērījumi un uzraudzība:

i) gaisa plūsma – ieteicams pastāvīgi kontrolēt gaisa plūsmas ātrumu kamerā;

ii) koncentrācija – pārbaudāmās vielas koncentrācijas svārstības ekspozīcijas laikā nedrīkst pārsniegt ± 15 % no tās vidējās vērtības;

iii) temperatūra un gaisa mitrums – ja izmanto grauzējus, temperatūrai jābūt 22 ± 2 °C, gaisa mitrumam kamerā jābūt 30-70 %, izņemot gadījumus, kad pārbaudāmās vielas suspendēšanai kameras atmosfērā izmanto ūdeni. Abi šie parametri nepārtraukti jāuzrauga;

iv) daļiņu lieluma mērījumi – ja izmanto šķidros vai cietos aerosolus, kameras atmosfērā jānosaka daļiņu sadalījums pēc lieluma. Aerosola daļiņām jābūt tādā lielumā, lai izmēģinājumu dzīvnieki tos varētu ieelpot. Kameras atmosfēras paraugi jāņem dzīvnieku inhalācijas zonā. Daļiņu sadalījumam gaisa paraugā jābūt tādam pašam kā gaisā, ko elpo dzīvnieki, un tam gravimetriski jāatbilst aerosola suspensijai kopumā pat tad, ja liela daļa aerosola nav ieelpojama. Gatavojot iekārtu izmēģinājumam, pietiekami bieži jāveic daļiņu lieluma analīze, lai pārliecinātos par aerosola noturīgumu; ekspozīcijas laikā tā jāveic tik bieži, lai pienācīgi noteiktu daļiņu sadalījuma nemainīgumu gaisā, ko ieelpo dzīvnieki.

Pārbaudes ilgums

Dzīvnieki saņem pārbaudāmo vielu vismaz 12 mēnešus.

Testa norise

Dzīvnieku novērošana

Vismaz vienreiz dienā dzīvniekus pakļauj rūpīgai klīniskajai pārbaudei. Bez tam dzīvniekus katru dienu novēro un gādā par to, lai samazinātu to zudumus izmēģinājuma laikā, piemēram, secējot vai iesaldējot mirušos dzīvniekus un nošķirot vai nokaujot vārgus vai mirstošus īpatņus. Dzīvnieki rūpīgi jānovēro, reģistrējot jebkuru toksicitātes simptomu parādīšanos un tālāko attīstību, kā arī jāsamazina dzīvnieku zudumi slimību, autolīzes vai kanibālisma dēļ.

Visiem dzīvniekiem reģistrē klīniskos simptomus, tostarp neiroloģiskās izmaiņas un izmaiņas acīs, kā arī mirstību. Jāreģistrē toksisko reakciju parādīšanās un tālākā attīstība, arī aizdomīgu audzēju rašanās.

Pirmo 13 nedēļu laikā katram dzīvniekam vienreiz nedēļā reģistrē ķermeņa svaru, vēlāk to dara vismaz ik pēc četrām nedēļām. Pirmo 13 nedēļu laikā katru nedēļu nosaka barības patēriņu, bet vēlāk apmēram ik pēc trim mēnešiem, ja vien veselības stāvokļa vai ķermeņa svara izmaiņu dēļ tas nav jādara citādi.

Hematoloģiskā izmeklēšana

Hematoloģiskā izmeklēšana (piemēram, hemoglobīna satura, hematokrīta skaitļa, kopējā eritrocītu skaita, kopējā leikocītu skaita, trombocītu un citu asins recēšanas rādītāju noteikšana) jāveic pēc trim mēnešiem, sešiem mēnešiem un tad apmēram ik pēc sešiem mēnešiem un vēl pēc izmēģinājuma beigām, ņemot asins paraugus no visiem katras grupas dzīvniekiem, ja tie nepieder pie grauzējiem, vai no 10 katra dzimuma žurkām. Ja iespējams, pēc katra laika intervāla paraugi jāņem no tām pašām žurkām. Bez tam, ja tie nav grauzēji, asins paraugs jāņem arī pirms izmēģinājuma.

Ja klīniskie novērojumi liecina par dzīvnieku veselības pasliktināšanos pētījuma laikā, šiem dzīvniekiem nosaka asins ainu.

Asins ainas noteikšanai izmanto asins paraugus no dzīvniekiem, kas saņēmuši augstāko devu, un no kontroles dzīvniekiem. Dzīvniekiem, kas saņem vielu mazākā devā(s), asins ainu nosaka tikai tad, ja starp dzīvniekiem, kas saņēmuši augstāko devu, un kontroles dzīvniekiem novēro lielas svārstības vai uz to norāda patoloģiskās izmaiņas.

Urīnanalīze

Paraugus urīnanalīzei ņem no visiem katras grupas dzīvniekiem, ja tie nepieder pie grauzējiem, vai no 10 katra dzimuma žurkām, ja iespējams, no tām pašām žurkām un ar tādu pašu laika intervālu kā hematoloģiskajiem izmeklējumiem. Grauzējiem, katram dzīvniekam atsevišķi vai visiem viena dzimuma/grupas paraugiem kopumā, veic šādas analīzes:

— izskats – tilpums un īpatnējais blīvums, katram dzīvniekam,

— olbaltumvielas, glikoze, ketoni, asins (puskvantitatīvi) urīnā,

— nogulsnes (puskvantitatīvi).

Klīniskā bioķīmija

Apmēram ik pēc sešiem mēnešiem un pēc izmēģinājuma beigām visiem katras grupas dzīvniekiem, ja tie nepieder pie grauzējiem, vai 10 katra dzimuma žurkām, ja iespējams, visos laika intervālos no tām pašām žurkām, ņem asins paraugus klīniskās bioķīmijas izmeklējumiem. Bez tam, ja tie nav grauzēji, asins paraugs jāņem arī pirms izmēģinājuma. No šiem paraugiem iegūst plazmu un veic šādas analīzes:

— kopējā olbaltumvielu koncentrācija,

— albumīna koncentrācija,

— aknu funkcionālā darbība (piemēram, sārmainās fosfatāzes aktivitāte, glutamātpiruvāttransaminā zes [1] aktivitāte un glutamātoksalacetāttransaminā zes [2] aktivitāte), gamma-glutamiltranspeptidāze, ornitīndekarboksilāze,

— ogļhidrātu metabolisms, piemēram, glikoze pēc badošanās,

— nieru funkcionālā darbība, piemēram, urīnvielas slāpeklis asinīs.

Autopsija

Visiem dzīvniekiem, arī tiem, kas miruši izmēģinājuma laikā, vai nokauti veselības stāvokļa dēļ, jāveic pilna autopsija. Pirms nokaušanas dzīvniekiem ņem asins paraugu asins ainas noteikšanai. Jāsaglabā visi audi ar makroskopiskām izmaiņām, audzēji vai audzējiem līdzīgi veidojumi. Jāmēģina rast korelāciju starp autopsijas datiem un mikroskopijas rezultātiem.

Visi orgāni un audi jāsaglabā histopatoloģiskajai izmeklēšanai. Tas parasti attiecas uz šādiem orgāniem un audiem – smadzenēm [3] (iegarenās smadzenēs/tilts, smadzenīšu garoza, smadzeņu garoza), hipofīzi, vairogdziedzeri (kopā ar epitēlijķermenīšiem), aizkrūts dziedzeri, plaušām (kopā ar traheju), sirdi, aortu, siekalu dziedzeriem, aknām [3], liesu, nierēm [3], virsnieru dziedzeriem [3], barības vadu, kuņģi, divpadsmitpirkstu zarnu, tukšo zarnu, līkumaino zarnu, aklo zarnu, lokzarnu, taisno zarnu, dzemdi, urīnpūsli, limfmezgliem, aizkuņģa dziedzeri, gonādām [3], papildu dzimumorgāniem, sieviš ķo piena dziedzeri, ādu, muskulatūru, perifērās nervu sistēmas nerviem, muguras smadzenēm (kakla, vidējais torakālais un gurnu rajons), krūškaulu ar kaula smadzenēm, augšstilba kaulu (kopā ar locītavu) un acīm. Vislabākais veids, kā saglabāt plaušu un urīnpūšļa audus, ir piepildīt šos orgānus ar fiksatoru; pienācīga plaušu histopatoloģiskā izmeklēšana pēc inhalācijas nav iespējama bez šādas apstrādes. Veicot īpašus klīniskos pētījumus, piemēram, pēc inhalācijas, jāpārbauda visi elpošanas orgāni, ieskaitot degunu, rīkli un balseni.

Ja ir veikti citi klīniskie izmeklējumi, tajos iegūtie dati jāapkopo pirms mikroskopiskās pārbaudes, jo tie var sniegt svarīgu informāciju patologam.

Histopatoloģija

Mikroskopā jāpārbauda visas patoloģiskās izmaiņas, it īpaši audzējus un citus veidojumus jebkurā orgānā. Bez tam ir ieteicams veikt šeit norādītās procedūras:

a) visu uzglabāto orgānu un audu mikroskopiskā izpēte kopā ar vispusīgu pārskatu par visām patoloģiskajām izmaiņām, kas novērotas:

   1. izmēģinājuma laikā mirušiem vai nokautiem dzīvniekiem;

   2. dzīvniekiem, kuri saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvniekiem;

b) jāpārbauda orgāni vai audi dzīvniekiem, kas saņēmuši mazāku pārbaudāmās vielas devu, un kuros, iespējams, vielas ietekmē, radušās anomālijas;

c) ja testa rezultāti liecina par to, ka parastais dzīvnieku mūža ilgums ir ievērojami samazinājies vai ka radušās sekas var ietekmēt toksisko reakciju, jāpārbauda dzīvnieki nākamajā devas grupā, kā tas norādīts iepriekš;

d) lai pienācīgi novērtētu izmaiņas, kas novērotas dzīvniekiem pēc vielas aplikācijas, jābūt informācijai par to, cik bieži izmantotās līnijas dzīvniekiem tādos pašos laboratorijas apstākļos reģistrē spontāni radušās anomālijas, proti, jābūt iepriekš iegūtiem datiem par kontroles dzīvniekiem.

(1) Pašreizējais nosaukums – seruma alanīnaminotransferāze.
(2) Pašreizējais nosaukums – seruma aspartātaminotransferāze.
(3) Šie orgāni, kas iegūti no 10 katra dzimuma dzīvniekiem katrā grupā (ja tie ir grauzēji) vai no visiem dzīvniekiem (ja tie nav grauzēji), kā arī vairogdziedzeris (kopā ar epitēlijķermenīšiem), kas izņemts visiem dzīvniekiem (ja tie nav grauzēji), ir jānosver.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājuma grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam novērotas izmaiņas, un katra izmaiņu tipa procentuālo īpatsvaru. Rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,

— testa apstākļi:

inhalācijas iekārtas apraksts, norādot

tās konstrukciju, modeli, izmērus, gaisa avotu, makrodaļiņu un aerosolu ģenerēšanas sistēmu, gaisa kondicionēšanas paņēmienu, izplūdes gaisa apstrādi un dzīvnieku turēšanas apstākļus izmēģinājumu kamerā, ja tādu izmanto. Apraksta ierīces temperatūras, gaisa mitruma un, vajadzības gadījumā, aerosolu koncentrācijas noturīguma vai daļiņu lieluma noteikšanai.

Ekspozīcijas režīms:

šie dati jāapkopo tabulā, norādot vidējās vērtības, kā arī svārstību diapazonu (piemēram, standartnovirzi) un, ja iespējams, minot arī:

a) gaisa plūsmas ātrumu inhalācijas iekārtā;

b) gaisa temperatūru un mitrumu;

c) nominālo koncentrāciju (inhalācijas iekārtā ievadītais pārbaudāmās vielas kopējais daudzums, kas izdalīts ar gaisa daudzumu);

d) nesējvielas tipu, jā tādu izmanto;

e) faktisko vielas koncentrāciju inhalācijas zonā;

f) daļiņu vidējo lielumu (vajadzības gadījumā),

— izmantotās devas (jānorāda arī nesējviela, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas,

— netoksiska deva,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,

— oftalmoloģijas dati,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti (arī urīnanalīzes rezultāti, ja tādi ir),

— autopsijas rezultāti,

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

KANCEROGENITĀTES NOTEIKŠANA

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcijas

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Izmantojot attiecīgo aplikācijas veidu, pārbaudāmo vielu parasti ievada septiņas dienas nedēļā vairākām izmēģinājumu dzīvnieku grupām; katra grupa saņem vienādu devu, un ekspozīcijas laiks aptver ievērojamu mūža daļu. Ekspozīcijas laikā un arī vēlāk izmēģinājumu dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes, jo īpaši audzēju rašanos.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus, jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās.

Izmēģinājumu dzīvnieki

Atkarībā no iepriekš veikto pētījumu rezultātiem var izmantot arī citu sugu dzīvniekus (ne tikai grauzējus). Izmanto jaunus un veselus dzīvniekus, kas pieder pie plaši izplatītām laboratorijas dzīvnieku līnijām, un vielu sāk ievadīt uzreiz pēc atšķiršanas.

Uzsākot izmēģinājumus, dzīvnieku ķermeņa svara svārstības nedrīkst būt lielākas par ± 20 % no vidējā svara. Ja subhroniskās toksicitātes noteikšanu pēc perorālas aplikācijas veic pirms ilglaicīga testa, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas/šķirnes un līnijas dzīvnieki.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Ja izmanto grauzējus, vienu un to pašu devu ievada vismaz 100 dzīvniekiem (50 mātītēm un 50 tēviņiem), un vienlaikus jābūt arī kontroles grupai. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī izmēģinājuma laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nokauti izmēģinājuma gaitā.

Izmantotās devas un aplikācijas biežums

Jāizmanto vismaz trīs dažādas devas, un vienlaikus jābūt kontroles grupai. Jāizvēlas tāda augstākā deva, kas izraisa nenozīmīgas toksiskuma pazīmes, piemēram, nelielus ķermeņa svara zudumus (līdz 10 %), un ievērojami neietekmē dzīvnieku mūža garumu, ja vien tas nav saistīts ar audzēju rašanos.

Vielas vismazākā devā nedrīkst traucēt dzīvnieku normālo augšanu, attīstību un mūža ilgumu vai izraisīt jebkādus toksicitātes simptomus. Parasti tai vajadzētu sasniegt vismaz 10 % no lielās devas.

Vidēji lielo devu(-as) izvēlas pa vidu starp lielo un mazo devu.

Izvēloties šīs devas, jāņem vērā iepriekšējo toksicitātes testu un pētījumu rezultāti.

Parasti pārbaudāmo vielu ievada katru dienu. Ja to pievieno dzeramajam ūdenim vai uzturam, tai visu laiku jābūt pieejamai dzīvniekiem.

Kontroles dzīvnieki

Vienlaikus jābūt kontroles dzīvniekiem, kas no pārējiem dzīvniekiem atšķiras tikai ar to, ka tie nesaņem pārbaudāmo vielu.

Īpašos gadījumos, piemēram, ja izmanto inhalācijas testu ar aerosolu vai perorālu aplikāciju ar emulgatoru, kura bioloģiskā aktivitāte nav zināma, papildus jābūt negatīvās kontroles grupai, kas nesaņem nesējvielu.

Ievadīšanas veids

Trīs galvenie ievadīšanas veidi ir perorāla vai ārīga aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas veida izvēle ir atkarīga no pārbaudāmās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā veidā cilvēki parasti nonāk saskarē ar šo vielu.

Perorāla aplikācija

Ja pārbaudāmā viela organismā nonāk caur kuņģa-zarnu traktu un ja tieši tādā veidā tā var apdraudēt cilvēkus, ieteicams izmantot perorālu aplikāciju, ja tam nav kontrindikāciju. Dzīvnieki var saņemt pārbaudāmo vielu kopā ar uzturu, dzeramo ūdeni vai kapsulās.

Dzīvnieki parasti saņem vielas devu katru dienu septiņas dienas nedēļā, jo, ja vielu ievada tikai piecas dienas nedēļā, "tukšajā laikā" dzīvnieki var atkopties, toksicitātes simptomi iet mazumā, kas savukārt ietekmē rezultātus un to novērtēšanu. Tomēr, galvenokārt aiz praktiskiem apsvērumiem, uzskata, ka ir arī pieļaujama vielas ievadīšana piecas dienas nedēļā.

Ārīga aplikācija

Ārīgu aplikāciju, uztriepjot vielu uz ādas, var izvēlēties tad, ja simulē vienu no galvenajiem veidiem, kā viela iekļūst cilvēku organismā, un kā modeli ādas bojājumu inducēšanai.

Inhalācijas tests

Tā kā, veicot inhalācijas testus, rodas lielākas tehniskas grūtības nekā tad, kad izmanto citus aplikācijas veidus, šeit sniegti sīkāki norādījumi attiecībā uz šo testu izmantošanu. Jāpiezīmē, ka atsevišķos gadījumos kā veiksmīgu alternatīvu var izmantot intratraheālu instilāciju.

Izvēloties ilglaicīgu ekspozīciju, parasti ņem vērā cilvēku iespējamo saskari ar vielu, tālab dzīvniekus katru dienu piecas reizes nedēļā uz sešām stundām ievieto inhalācijas kamerā ar vienmērīgu vielas koncentrāciju (periodiskā ekspozīcija) vai, ņemot vērā iespējamo vielas klātbūtni apkārtējā vidē, tos katru dienu 7 dienas nedēļā uz 22-24 stundām pakļauj vielas iedarbībai (nepārtrauktā ekspozīcija), katru dienu vienādā laikā paredzot vienu stundu dzīvnieku barošanai un inhalācijas kameras apkopšanai. Parasti abos gadījumos dzīvnieki saņem pārbaudāmo vielu noteiktā koncentrācijā.

Galvenā atšķirība starp periodisko un nepārtraukto ekspozīciju ir tā, ka pirmajā gadījumā, beidzoties iedarbībai, dzīvnieki var atkopties 17-18 stundu laikā, un nedēļas nogalē šis atkopšanās laiks ir vēl garāks.

Periodiskās vai nepārtrauktās ekspozīcijas izvēle ir atkarīga no pētījuma mērķiem un no izvēlētā modeļa, kas simulē apstākļus, kādos cilvēki nonāk saskarē ar vielu. Šeit tomēr jārēķinās ar dažām tehniskām grūtībām. Piemēram, nepārtrauktās ekspozīcijas priekšrocības, modelējot apkārtējas vides apstākļus, var mazināt tas, ka ekspozīcijas laikā dzīvnieki jābaro un jāizmanto daudz sarežģītākas (un precīzākas) aerosola un tvaika ģenerēšanas un kontroles metodes.

Inhalācijas kameras

Izmēģinājumos ar dzīvniekiem izmanto inhalācijas kameras, kas nodrošina dinamisku gaisa plūsmu (vismaz 12 gaisa maiņas stundā), pietiekamu skābekļa koncentrāciju un vienmērīgu atmosfēru ekspozīcijas laikā. Kontroles un izmēģinājumu dzīvniekiem izmanto vienādas uzbūves un konstrukcijas inhalācijas kameras, kas nodrošina līdzvērtīgus ekspozīcijas apstākļus, izņemot pārbaudāmās vielas klātbūtni. Gaisa spiediens kamerā parasti ir nedaudz pazemināts, lai izvairītos no pārbaudāmās vielas izplūšanas apkārtējā vidē. Kamerās jābūt pietiekami daudz vietas izmēģinājumu dzīvniekiem. Parasti, lai kamerā būtu noturīga atmosfēra, izmēģinājumu dzīvnieku kopējais "tilpums" nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma.

Jāveic šādu parametru mērījumi un uzraudzība:

i) gaisa plūsma – ieteicams pastāvīgi kontrolēt gaisa plūsmas ātrumu kamerā;

ii) koncentrācija – ikdienas ekspozīcijas laikā pārbaudāmās vielas koncentrācijas svārstības nedrīkst pārsniegt ± 15 % no tās vidējās vērtības. Visā izmēģinājuma laikā katru dienu pēc iespējas jācenšas nodrošināt nemainīgu vielas koncentrāciju;

iii) temperatūra un gaisa mitrums – ja izmanto grauzējus, temperatūrai jābūt 22 ± 2 °C, gaisa mitrumam kamerā jābūt 30-70 %, izņemot gadījumus, kad pārbaudāmās vielas suspendēšanai kameras atmosfērā izmanto ūdeni. Abi šie parametri nepārtraukti jāuzrauga;

iv) daļiņu lieluma mērījumi – ja izmanto šķidros vai cietos aerosolus, kameras atmosfērā jānosaka daļiņu sadalījums pēc lieluma. Aerosola daļiņām jābūt tādā lielumā, lai izmēģinājumu dzīvnieki tās varētu ieelpot. Kameras atmosfēras paraugi jāņem dzīvnieku inhalācijas zonā. Daļiņu sadalījumam gaisa paraugā jābūt tādam pašam kā gaisā, ko elpo dzīvnieki, un tam gravimetriski jāatbilst aerosola suspensijai kopumā pat tad, ja liela daļa aerosola nav ieelpojama. Gatavojot iekārtu izmēģinājumam, pietiekami bieži jāveic daļiņu lieluma analīze, lai pārliecinātos par aerosola noturīgumu; ekspozīcijas laikā tā jāveic tik bieži, lai pienācīgi noteiktu daļiņu sadalījuma nemainīgumu gaisā, ko ieelpo dzīvnieki.

Testa ilgums

Kancerogenitātes pētījumi aptver izmēģinājumu dzīvnieku parastā mūža ilguma lielāko daļu. Pētījumi ar pelēm un kāmjiem ilgst 18 mēnešus, ar žurkām – 24 mēnešus, taču, ja izmanto dažas dzīvnieku līnijas, kam ir garāks mūža ilgums un/vai retāk reģistrē spontāni radušos audzējus, to ilgumu pelēm un kāmjiem pagarina līdz 24 mēnešiem, bet žurkām – līdz 30 mēnešiem. Tomēr šādus pagarinātos pētījumus var pārtraukt, ja izdzīvojušo dzīvnieku skaits pēc mazākās devas aplikācijas vai kontroles grupā ir sasniedzis 25 %. Ja pētījuma beigās atklājas, ka atkarībā no dzimuma dzīvnieki reaģē krasi atšķirīgi, datus par katru dzimumu apkopo atsevišķi. Ja priekšlaicīgi mirst tikai dzīvnieki, kas saņēmuši lielo devu, jo tā ir izteikti toksiska, pētījumi nav jāpārtrauc, ja vien citās dzīvnieku grupās nerodas problēmas toksicitātes dēļ. Negatīvs testa iznākums ir atzīstams par vērā ņemamu, ja dzīvnieku zudumi izmēģinājuma laikā autolīzes, kanibālisma vai tehnisku problēmu dēļ nepārsniedz 10 % un visās grupās ne mazāk kā 50 % dzīvnieku ir izdzīvojuši pēc 18 mēnešiem, ja tās ir peles, un pēc 24 mēnešiem, ja tās ir žurkas.

Testa norise

Dzīvnieku novērošana

Novērojot dzīvniekus, katru dienu jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas

Pastāvīga dzīvnieku novērošana ļauj iespēju robežās samazināt dzīvnieku zudumus izmēģinājuma laikā kanibālisma, audu autolīzes vai nepiemērotu turēšanas apstākļu dēļ. Pamanot mirstošus dzīvniekus, tos uzreiz nošķir no pārējiem un secē.

Visiem dzīvniekiem reģistrē klīniskās pazīmes un nāves iestāšanos. Īpaši uzmanīgi jāseko audzēju attīstībai, reģistrējot katra skaidri saskatāma vai sataustāma audzēja parādīšanās brīdi, atrašanās vietu, izmērus, izskatu un tālāko attīstību.

Izmēģinājuma pirmo 13 nedēļu laikā barības patēriņš (un ūdens patēriņš, ja pārbaudāmā viela pievienota dzeramajam ūdenim) jānosaka katru nedēļu un pēc tam apmēram ik pēc trim mēnešiem, ja vien veselības stāvokļa vai ķermeņa svara izmaiņu dēļ nav jārīkojas citādi.

Izmēģinājuma pirmo 13 nedēļu laikā vienreiz nedēļā jāreģistrē katra dzīvnieka ķermeņa svars, bet vēlāk to dara vismaz ik pēc četrām nedēļām.

Klīniskās pārbaudes

Hematoloģija

Ja dzīvnieku novērojumi izmēģinājuma gaitā liecina par veselības stāvokļa pasliktināšanos, šiem dzīvniekiem pārbauda asins ainu.

Pēc 12 mēnešiem, 18 mēnešiem un pirms nokaušanas visiem dzīvniekiem ņem asinis un gatavo uztriepes. Asins ainas noteikšanai izmanto asins paraugus no dzīvniekiem pēc lielās devas aplikācijas un no kontroles dzīvniekiem. Ja šie dati, it īpaši tie, kas iegūti pirms nokaušanas, kā arī autopsijas rezultāti norāda uz tādu vajadzību, asins ainu pārbauda arī nākamās(-o) grupas(-u) dzīvniekiem, kas saņēmuši mazāku devu(-as).

Autopsija

Visiem dzīvniekiem, arī tiem, kas miruši izmēģinājuma laikā vai nokauti veselības stāvokļa dēļ, veic pilnu autopsiju. Jāsaglabā visi skaidri saredzami audzēji vai audi ar patoloģiskām izmaiņām un audzējiem līdzīgi veidojumi.

Piemērotā vidē jāsaglabā šādi orgāni un audi, lai turpmāk būtu iespējama to histopatoloģiskā izmeklēšana: smadzenes (ieskaitot iegareno smadzeņu/tilta audu paraugus, smadzenīšu garozu, smadzeņu garozu), hipofīze, vairogdziedzeris/epitēlijķermenīši, aizkrūts dziedzera audi, traheja un plaušas, sirds, aorta, siekalu dziedzeri, aknas, liesa, nieres, virsnieru dziedzeri, aizkuņģa dziedzeris, gonādas, dzemde, papildu dzimumorgāni, āda, barības vads, kuņģis, divpadsmitpirkstu zarna, tukšā zarna, līkumainā zarna, aklā zarna, lokzarna, taisnā zarna, urīnpūslis, limfmezglu paraugi, sievišķais piena dziedzeris, augšstilba muskulatūra, perifērās nervu sistēmas nervi, krūškauls ar kaula smadzenēm, augšstilba kauls (ar locītavu), triju līmeņu muguras smadzenes (no kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona) un acis.

Vislabākais veids, kā saglabāt plaušu un urīnpūšļa audus, ir piepildīt šos orgānus ar fiksatoru; pienācīga plaušu histopatoloģiskā izmeklēšana pēc inhalācijas nav iespējama bez šādas apstrādes. Pēc inhalācijas testa jāsaglabā visi elpošanas orgāni, ieskaitot deguna dobumu, rīkli un balseni.

Histopatoloģija

a) Orgānu un audu pilnu histopatoloģisko izmeklēšanu veic visiem pārbaudes laikā mirušiem vai nokautiem dzīvniekiem, kā arī visiem kontroles dzīvniekiem un dzīvniekiem pēc lielo devu aplikācijas.

b) Visu grupu dzīvniekiem mikroskopiski pārbauda visus skaidri saredzamus audzējus vai audzējam līdzīgus veidojumus.

c) Ja jaunveidojumu biežums dzīvnieku grupā pēc lielākās devas iedarbības un kontroles grupā ievērojami atšķiras, arī pārējās grupās jāveic šā konkrētā orgāna vai audu histopatoloģiskā izmeklēšana.

d) Ja mirstība dzīvnieku grupā pēc lielākās devas iedarbības ir ievērojami lielāka nekā kontroles grupā, vispusīgi jāpārbauda nākamās grupas dzīvnieki, kas saņēmuši mazāku devu.

e) Ja pēc lielās devas aplikācijas novēro toksicitāti vai citus simptomus, kas var ietekmēt audzēju rašanos, vispusīgi jāpārbauda nākamās grupas dzīvnieki, kas saņēmuši mazāku devu.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam izmēģinājuma laikā novēroti audzēji, novērošanas brīdi un to dzīvnieku skaitu, kam audzēji atklāti pēc nokaušanas. Rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,

— testa apstākļi:

inhalācijas iekārtas apraksts, norādot

tās konstrukciju, modeli, izmērus, gaisa avotu, makrodaļiņu un aerosolu ģenerēšanas sistēmu, gaisa kondicionēšanas paņēmienu, izplūdes gaisa apstrādi un dzīvnieku turēšanas apstākļus izmēģinājumu kamerā, ja tādu izmanto. Jāapraksta ierīces temperatūras, gaisa mitruma un, vajadzības gadījumā, aerosolu koncentrācijas noturīguma vai daļiņu lieluma noteikšanai;

ekspozīcijas režīms:

šie dati jāapkopo tabulā, norādot vidējās vērtības, kā arī svārstību diapazonu (piemēram, standartnovirzi) un, ja iespējams, minot arī:

a) gaisa plūsmas ātrumu inhalācijas iekārtā;

b) gaisa temperatūru un mitrumu;

c) nominālo koncentrāciju (inhalācijas iekārtā ievadītais pārbaudāmās vielas kopējais daudzums, kas izdalīts ar gaisa daudzumu);

d) nesējvielas tipu, jā tādu izmanto;

e) faktisko vielas koncentrāciju inhalācijas zonā;

f) daļiņu vidējo lielumu (vajadzības gadījumā),

— izmantotās devas (jānorāda arī nesējviela, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— dati par audzēju biežumu atkarībā no dzimuma, devas un audzēju tipa,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas,

— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— dati par barības patēriņu un ķermeņa svaru,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

— autopsijas rezultāti,

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde un izmantotās metodes,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

VIENLAICĪGA HRONISKĀS TOKSICITĀTES UN KANCEROGENITĀTES NOTEIKŠANA

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcijas**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Vienlaicīga hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes noteikšana ļauj pārbaudīt vielas hronisko un kancerogēno iedarbību uz zīdītājiem pēc ilgstošas ekspozīcijas.

Tādēļ kancerogenitātes noteikšanai izmanto vismaz vēl vienu papildu grupu, kas saņem pārbaudāmo vielu, un papildu kontroles grupu. Deva, ko saņem papildu grupas dzīvnieki, var būt lielāka par lielāko devu, ko izmanto kancerogenitātes testam. Dzīvniekiem, ko izmanto kancerogenitātes noteikšanai, pārbauda gan vispārējo toksicitāti, gan audzēju rašanos. Papildu grupas dzīvniekiem pēc vielas aplikācijas pārbauda vispārējo toksicitāti.

Izmantojot attiecīgo aplikācijas veidu, pārbaudāmo vielu parasti ievada septiņas dienas nedēļā vairāku izmēģinājumu grupu dzīvniekiem; katra grupa saņem vienādu devu, un ekspozīcijas laiks aptver ievērojamu mūža daļu. Ekspozīcijas laikā un arī vēlāk izmēģinājumu dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes un audzēju rašanos.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Veselus, jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās.

Izmēģinājumu dzīvnieki

Šim nolūkam ieteicams izmantot žurkas. Pamatojoties uz iepriekšējo testu rezultātiem, var izmantot arī citu sugu dzīvniekus (ne tikai grauzējus). Izmanto jaunus un veselus dzīvniekus, kas pieder pie plaši izplatītām laboratorijas dzīvnieku līnijām, un vielu sāk ievadīt uzreiz pēc atšķiršanas.

Uzsākot testu, dzīvnieku ķermeņa svara svārstības nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara. Ja subhroniskās toksicitātes testu pēc perorālas aplikācijas veic pirms ilglaicīga testa, abos pētījumos jāizmanto tās pašas sugas un šķirnes/līnijas dzīvnieki.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Ja izmanto grauzējus, vienu un to pašu devu ievada vismaz 100 dzīvniekiem (50 mātītēm un 50 tēviņiem), vienlaikus jābūt arī kontroles grupai. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ja dzīvnieku nonāvēšana paredzēta arī izmēģinājuma laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kuri tiks nokauti izmēģinājuma gaitā.

Papildu grupā(s), kurā(s) dzīvniekiem pēc vielas iedarbības pārbauda patoloģiskas izmaiņas, izņemot audzējus, jābūt pa 20 abu dzimumu īpatņiem, bet kontroles grupā pa 10 abu dzimumu īpatņiem.

Izmantotās devas un aplikācijas biežums

Kancerogenitātes noteikšanai izmanto vismaz trīs dažādas devas, un vienlaikus jābūt arī kontroles grupai. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas izraisa nenozīmīgas toksiskuma pazīmes, piemēram, nelielus ķermeņa svara zudumus (līdz 10 %), un ievērojami neietekmē dzīvnieku mūža garumu, ja vien tas nav saistīts ar audzēju rašanos.

Viela vismazākajā devā nedrīkst traucēt dzīvnieku normālo augšanu, attīstību un mūža ilgumu vai izraisīt jebkādus toksicitātes simptomus. Parasti tai vajadzētu sasniegt vismaz 10 % no lielās devas.

Vidēji lielo devu(-as) izvēlas pa vidu starp lielo un mazo devu. Izvēloties šīs devas, jāņem vērā iepriekšējo toksicitātes testu un pētījumu rezultāti.

Hroniskās toksicitātes noteikšanai izmanto papildu grupas, kurās dzīvnieki saņem pārbaudāmo vielu, un vienlaikus jābūt arī papildu kontroles grupai.

Vielas lielākajai devai, ko saņem papildu grupas dzīvnieki, jābūt izteikti toksiskai.

Pārbaudāmo vielu parasti ievada katru dienu. Ja vielu pievieno dzeramajam ūdenim vai uzturam, tai visu laiku jābūt pieejamai dzīvniekiem.

Kontroles dzīvnieki

Vienlaikus jābūt kontroles dzīvniekiem, kas atšķiras no pārējiem dzīvniekiem tikai ar to, ka nesaņem pārbaudāmo vielu.

Īpašos gadījumos, piemēram, ja izmanto inhalācijas testu ar aerosolu vai perorālu aplikāciju ar emulgatoru, kura bioloģiskā aktivitāte nav zināma, papildus jābūt negatīvās kontroles grupai, kas nesaņem šķīdinātāju/nesējvielu.

Ievadīšanas veids

Trīs galvenie ievadīšanas veidi ir perorāla vai ārīga aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas veida izvēle ir atkarīga no pārbaudāmās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā veidā cilvēki parasti nonāk saskarē ar šo vielu.

Perorāla aplikācija

Ja pārbaudāmā viela organismā nonāk caur kuņģa-zarnu traktu, un ja tieši tādā veidā tā var apdraudēt cilvēkus, ieteicams izmantot perorālu aplikāciju, ja tam nav kontrindikāciju. Dzīvnieki var saņemt pārbaudāmo vielu kopā ar uzturu, dzeramo ūdeni vai kapsulās. Dzīvnieki parasti saņem vielas devu katru dienu septiņas dienas nedēļā, jo, ja vielu ievada tikai piecas dienas nedēļā, "tukšajā laikā" dzīvnieki var atkopties, toksicitātes simptomi iet mazumā, kas savukārt ietekmē rezultātus un to novērtēšanu. Tomēr, galvenokārt pamatojoties uz praktiskiem apsvērumiem, uzskata, ka ir arī pieļaujama vielas ievadīšana piecas dienas nedēļā.

Ārīga aplikācija

Ārīgu aplikāciju, uztriepjot vielu uz ādas, var izvēlēties tad, ja simulē vienu no galvenajiem veidiem, kā viela iekļūst cilvēku organismā, un ja to izmanto kā modeli ādas bojājumu inducēšanai.

Inhalācijas tests

Tā kā, veicot inhalācijas testu, rodas lielākas tehniskas grūtības nekā tad, kad izmanto citus aplikācijas veidus, šeit sniegti sīkāki norādījumi attiecībā uz šā testa izmantošanu. Jāpiezīmē, ka atsevišķos gadījumos kā veiksmīgu alternatīvu var izmantot intratraheālu instilāciju.

Izvēloties ilglaicīgu ekspozīciju, parasti ņem vērā cilvēku iespējamo saskari ar vielu, tālab dzīvniekus katru dienu piecas reizes nedēļā uz sešām stundām ievieto inhalācijas kamerā ar vienmērīgu vielas koncentrāciju (periodiskā ekspozīcija) vai, ņemot vērā iespējamo vielas klātbūtni apkārtējā vidē, tos katru dienu septiņas dienas nedēļā uz 22-24 stundām pakļauj vielas iedarbībai (nepārtrauktā ekspozīcija), katru dienu vienādā laikā paredzot vienu stundu dzīvnieku barošanai un inhalācijas kameras apkopšanai. Parasti abos gadījumos dzīvnieki saņem pārbaudāmo vielu noteiktā koncentrācijā. Galvenā atšķirība starp periodisko un nepārtraukto ekspozīciju ir tā, ka pirmajā gadījumā, beidzoties iedarbībai, dzīvnieki var atkopties 17-18 stundu laikā, un nedēļas nogalē šis atkopšanās laiks ir vēl garāks.

Periodiskās vai nepārtrauktās ekspozīcijas izvēle ir atkarīga no pētījuma mērķiem un no izvēlētā modeļa, kas simulē apstākļus, kādos cilvēki nonāk saskarē ar šo vielu. Šeit tomēr jārēķinās ar dažām tehniskām grūtībām. Piemēram, nepārtrauktās ekspozīcijas priekšrocības, modelējot apkārtējās vides apstākļus, var mazināt tas, ka ekspozīcijas laikā dzīvnieki jābaro un ir jāizmanto daudz sarežģītākas (un precīzākas) aerosola un tvaika ģenerēšanas un kontroles metodes.

Inhalācijas kameras

Izmēģinājumos ar dzīvniekiem izmanto inhalācijas kameras, kas nodrošina dinamisku gaisa plūsmu (vismaz 12 gaisa maiņas stundā), pietiekamu skābekļa koncentrāciju un vienmērīgu atmosfēru ekspozīcijas laikā. Kontroles un izmēģinājumu dzīvniekiem izmanto vienādas uzbūves un konstrukcijas inhalācijas kameras, kas nodrošina līdzvērtīgus ekspozīcijas apstākļus, izņemot pārbaudāmās vielas klātbūtni. Gaisa spiediens kamerā parasti ir nedaudz pazemināts, lai izvairītos no pārbaudāmās vielas izplūšanas apkārtējā vidē. Kamerās jābūt pietiekami daudz vietas izmēģinājumu dzīvniekiem. Parasti, lai kamerā būtu noturīga atmosfēra, izmēģinājumu dzīvnieku kopējais "tilpums" nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma.

Jāveic šādu parametru mērījumi un uzraudzība:

i) gaisa plūsma – vēlams pastāvīgi kontrolēt gaisa plūsmas ātrumu kamerā;

ii) vielas koncentrācijas svārstības ekspozīcijas laikā nedrīkst pārsniegt ± 15 % no vidējās vērtības. Visā izmēģinājuma laikā katru dienu pēc iespējas jācenšas nodrošināt nemainīgu vielas koncentrāciju;

iii) temperatūra un gaisa mitrums – ja izmanto grauzējus, temperatūrai jābūt 22 ± 2 °C, gaisa mitrumam kamerā jābūt 30-70 %, izņemot gadījumus, kad pārbaudāmās vielas suspendēšanai kameras atmosfērā izmanto ūdeni. Abi šie parametri nepārtraukti jāuzrauga;

iv) daļiņu lieluma mērījumi – ja izmanto šķidros vai cietos aerosolus, kameras atmosfērā jānosaka daļiņu sadalījums pēc lieluma. Aerosola daļiņām jābūt tādā lielumā, lai izmēģinājumu dzīvnieki tās varētu ieelpot. Kameras atmosfēras paraugi jāņem dzīvnieku inhalācijas zonā. Daļiņu sadalījumam gaisa paraugā jābūt tādam pašam kā gaisā, ko elpo dzīvnieki, un tam gravimetriski jāatbilst aerosola suspensijai kopumā pat tad, ja liela daļa aerosola nav ieelpojama. Gatavojot iekārtu izmēģinājumam, pietiekami bieži jāveic daļiņu lieluma analīze, lai pārliecinātos par aerosola noturīgumu; ekspozīcijas laikā tā jāveic tik bieži, lai pienācīgi noteiktu daļiņu sadalījuma nemainīgumu gaisā, ko elpo dzīvnieki.

Testa ilgums

Tieši kancerogenitātes noteikšana aizņem izmēģinājumu dzīvnieku mūža ilguma lielāko daļu. Pētījumi ar pelēm un kāmjiem ilgst 18 mēnešus, ar žurkām – 24 mēnešus, taču, ja izmanto dažas dzīvnieku līnijas, kam ir garāks mūža ilgums un/vai kam retāk reģistrē spontāni radušos audzējus, to ilgumu pelēm un kāmjiem pagarina līdz 24 mēnešiem, bet žurkām – līdz 30 mēnešiem. Tomēr šos pagarinātos pētījumus var pārtraukt, ja izdzīvojušo dzīvnieku skaits pēc mazākās devas aplikācijas vai kontroles grupā ir sasniedzis 25 %. Ja pētījuma beigās atklājas, ka atkarībā no dzimuma dzīvnieki reaģē krasi atšķirīgi, datus par katru dzimumu apkopo atsevišķi. Ja priekšlaicīgi mirst tikai dzīvnieki, kas saņēmuši lielo devu, jo tā ir izteikti toksiska, pētījumi nav jāpārtrauc, ja vien citās dzīvnieku grupās nerodas problēmas toksicitātes dēļ. Negatīvs pētījumu iznākums atzīstams par vērā ņemamu, ja dzīvnieku zudumi izmēģinājumā laikā autolīzes, kanibālisma vai tehnisku problēmu dēļ visās grupās nepārsniedz 10 % un visās grupās ne mazāk kā 50 % dzīvnieku ir izdzīvojuši pēc 18 mēnešiem, ja tās ir peles, un pēc 24 mēnešiem, ja tās ir žurkas.

Papildu grupas, kurās ir pa 20 katra dzimuma dzīvniekiem, un attiecīgie kontroles dzīvnieki (pa 10 no katra dzimuma), kam pārbauda hronisko toksicitāti, jāsaglabā vismaz 12 mēnešus. Šos dzīvniekus paredzēts secēt, lai pārbaudītu vielas izraisītās patoloģiskās izmaiņas, kuras nav radušās novecošanas gaitā.

Testa norise

Dzīvnieku novērošana

Novērojot dzīvniekus, katru dienu jāpievērš uzmanība izmaiņām, kas skar ādu, acis un gļotādas, kā arī elpošanas orgānus, asinsriti, veģetatīvo un centrālo nervu sistēmu, somatomotoriku un uzvedības reakcijas

Papildu grupas(-u) dzīvniekus, kas saņem pārbaudāmo vielu, pēc attiecīgiem laika intervāliem pakļauj klīniskajai izmeklēšanai.

Pastāvīga dzīvnieku novērošana ļauj iespēju robežās pārliecināties, ka nerodas dzīvnieku zudumi kanibālisma, audu autolīzes vai nepareizu turēšanas apstākļu dēļ. Pamanot mirstošus dzīvniekus, tos uzreiz nošķir no pārējiem un secē.

Visiem dzīvniekiem reģistrē klīniskos simptomus, tostarp neiroloģiskās izmaiņas un izmaiņas acīs, kā arī nāves iestāšanos. Īpaši uzmanīgi jāseko audzēju attīstībai, reģistrējot katra skaidri saskatāma vai sataustāma audzēja parādīšanās brīdi, atrašanās vietu, izmērus, izskatu un tālāko attīstību. Jāreģistrē toksicitātes simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība.

Izmēģinājuma pirmo 13 nedēļu laikā barības patēriņš (un ūdens patēriņš, ja pārbaudāmā viela pievienota dzeramajam ūdenim) jānosaka katru nedēļu un pēc tam apmēram ik pēc trim mēnešiem, ja vien veselības stāvokļa vai ķermeņa svara izmaiņu dēļ nav jārīkojas citādi.

Izmēģinājuma pirmo 13 nedēļu laikā vienreiz nedēļā jāreģistrē katra dzīvnieka ķermeņa svars, bet vēlāk to dara vismaz ik pēc četrām nedēļām.

Klīniskās pārbaudes

Hematoloģija

Hematoloģiskā izmeklēšana (piem., hemoglobīna satura, hematokrīta skaitļa, kopējā eritrocītu skaita, kopējā leikocītu skaita, trombocītu un citu asins recēšanas rādītāju noteikšana) jāveic pēc trim mēnešiem, sešiem mēnešiem, tad apmēram ik pēc sešiem mēnešiem un vēl izmēģinājuma beigās, ņemot asins paraugus no 10 katra dzimuma žurkām visās dzīvnieku grupās. Ja iespējams, pēc katra laika intervāla paraugi jāņem no tām pašām žurkām.

Ja dzīvnieku novērojumi liecina par veselības stāvokļa pasliktināšanos izmēģinājuma gaitā, tiem jāpārbauda asins aina.

Asins ainas noteikšanai izmanto asins paraugus no dzīvniekiem, kas saņēmuši lielāko devu, un no kontroles dzīvniekiem. Dzīvniekiem, kas saņēmuši vielu mazākā(s) devā(s), asins ainu nosaka tikai tad, ja starp dzīvniekiem, kas saņēmuši lielāko devu, un kontroles dzīvniekiem novēro lielas svārstības vai ja tas izriet no autopsijas rezultātiem.

Urīnanalīze

Paraugus urīnanalīzei ņem no 10 katra dzimuma žurkām visās grupās, ja iespējams, no tām pašām žurkām un ar tādiem pašiem laika intervāliem kā hematoloģiskajiem izmeklējumiem. Ja izmanto grauzējus, katram dzīvniekam atsevišķi vai visiem viena dzimuma/grupas paraugiem kopumā veic šādas analīzes:

— izskats – tilpums un īpatnējais blīvums katram dzīvniekam,

— olbaltumvielas, glikoze, ketoni, asins (puskvantitatīvi) urīnā,

— nogulsnes (puskvantitatīvi).

Klīniskā bioķīmija

Apmēram ik pēc sešiem mēnešiem un izmēģinājuma beigās visiem dzīvniekiem, kas nepieder pie grauzējiem, un 10 katra dzimuma žurkām visās grupās, ja iespējams, pēc katra laika intervāla no tām pašām žurkām, ņem asins paraugus klīniskās bioķīmijas izmeklējumiem. Bez tam, ja tie nav grauzēji, asins paraugs jāņem arī pirms izmēģinājuma. No šiem paraugiem iegūst plazmu un tajā nosaka:

— olbaltumvielu kopējo koncentrāciju,

— albumīna koncentrāciju,

— aknu funkcionālo darbību (piemēram, sārmainās fosfatāzes aktivitāti, glutamātpiruvāttransamināzes [1] aktivitāti un glutamātoksalacetāttransamināzes [2] aktivitāti), gamma-glutamiltranspeptidāzi, ornitīndekarboksilāzi,

— ogļhidrātu metabolismu, piemēram, glikozi pēc badošanās,

— nieru funkcionālo darbību, piemēram urīnvielas slāpekli asinīs.

[1] Pašreizējais nosaukums – seruma alanīnaminotransferāze.
[2] Pašreizējais nosaukums – seruma aspartātaminotransferāze.

Autopsija

Visiem dzīvniekiem, arī tiem, kas miruši izmēģinājuma laikā vai nokauti veselības stāvokļa dēļ, veic pilnu autopsiju. Pirms nokaušanas dzīvniekiem ņem asins paraugu asins ainas noteikšanai. Jāsaglabā visi skaidri saredzami audzēji vai audzējiem līdzīgi veidojumi. Jāmēģina rast korelāciju starp autopsijas datiem un mikroskopijas rezultātiem.

Visi orgāni un audi jāsaglabā histopatoloģiskajai izmeklēšanai. Tas parasti attiecas uz šādiem orgāniem un audiem – smadzenēm [1] (iegarenās smadzenēs/tilts, smadzenīšu garoza, smadzeņu garoza), hipofīzi, vairogdziedzeri (kopā ar epitēlijķermenīšiem), aizkrūts dziedzeri, plaušām (kopā ar traheju), sirdi, aortu, siekalu dziedzeriem, aknām [1], liesu, nierēm [1], virsnieru dziedzeriem [1], barības vadu, kuņģi, divpadsmitpirkstu zarnu, tukšo zarnu, līkumaino zarnu, aklo zarnu, lokzarnu, taisno zarnu, dzemdi, urīnpūsli, limfmezgliem, aizkuņģa dziedzeri, gonādām [1], papildu dzimumorgāniem, sieviešķo piena dziedzeri, ādu, muskulatūru, perifērās nervu sistēmas nerviem, muguras smadzenēm (kakla, vidējais torakālais un gurnu rajons), krūšu kaulu ar kaula smadzenēm, augšstilba kaulu (kopā ar locītavu) un acīm.

Vislabākais veids, kā saglabāt plaušu un urīnpūšļa audus, ir piepildīt šos orgānus ar fiksatoru; pienācīga plaušu histopatoloģiskā izmeklēšana pēc inhalācijas nav iedomājama bez šādas apstrādes. Veicot īpašus klīniskos pētījumus, piemēram, pēc inhalācijas, jāpārbauda visi elpošanas orgāni, ieskaitot degunu, rīkli un balseni.

Ja ir veikti citi klīniskie izmeklējumi, tajos iegūtie dati jāapkopo pirms mikroskopiskās pārbaudes, jo tie var sniegt svarīgu informāciju patologam.

Histopatoloģija

Hroniskās toksicitātes noteikšanai –

rūpīgi jāizmeklē visi uzglabātie orgāni, kas paņemti no katra dzīvnieka papildu grupā pēc lielākās devas aplikācijas un kontroles grupā. Ja papildu grupas dzīvniekiem pēc lielākās devas aplikācijas konstatē patoloģiskas izmaiņas, ko izraisījusi pārbaudāmā viela, visiem pārējiem dzīvniekiem visās papildu grupās pēc vielas iedarbības, kā arī dzīvnieku grupās, kurām ievadīta viela kancerogenitātes testa laikā, veic iedarbības skarto orgānu vispusīgu un padziļinātu histoloģisko izmeklēšanu.

Kancerogenitātes noteikšanai:

a) orgānu un audu pilnu histopatoloģisko izmeklēšanu veic visiem testa laikā mirušiem vai nokautiem dzīvniekiem, kā arī visiem kontroles dzīvniekiem un dzīvniekiem pēc lielākās devas aplikācijas;

b) visās grupās mikroskopiski pārbauda visus skaidri saredzamus audzējus vai audzējam līdzīgus veidojumus neatkarīgi no orgāna;

c) ja jaunveidojumu biežums dzīvnieku grupā pēc lielākās devas aplikācijas un kontroles grupā ievērojami atšķiras, arī pārējās grupās jāveic šā konkrētā orgāna vai audu histopatoloģiskā izmeklēšana;

d) ja mirstība dzīvnieku grupā pēc lielākās devas aplikācijas ir ievērojami lielāka nekā kontroles grupā, vispusīgi jāpārbauda nākamās grupas dzīvnieki, kas saņēmuši mazāku devu;

e) ja pēc lielās devas aplikācijas novēro toksicitāti vai citus simptomus, kas var ietekmēt audzēju rašanos, vispusīgi jāpārbauda nākamās grupas dzīvnieki, kas saņēmuši mazāku devu.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kam izmēģinājuma laikā novēroti audzēji vai toksicitātes simptomi, novērošanas brīdi un to dzīvnieku skaitu, kam audzēji atklāti pēc nokaušanas. Rezultāti jānovērtē, izmantojot piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru atzītu statistikas metodi.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija/celms, izcelsme, turēšanas apstākļi, barība utt.,

[1] Šie orgāni, kas iegūti no 10 katra dzimuma grauzējiem visās grupās, ir jānosver.

— testa apstākļi:

inhalācijas iekārtas apraksts, norādot

tās konstrukciju, modeli, izmērus, gaisa avotu, makrodaļiņu un aerosolu ģenerēšanas sistēmu, gaisa kondicionēšanas paņēmienu, izplūdes gaisa apstrādi un dzīvnieku turēšanas apstākļus izmēģinājumu kamerā, ja tādu izmanto. Jāapraksta ierīces temperatūras, gaisa mitruma un, vajadzības gadījumā, aerosolu koncentrācijas noturīguma vai daļiņu lieluma noteikšanai;

ekspozīcijas režīms –

šie dati jāapkopo tabulā, norādot vidējās vērtības, kā arī svārstību diapazonu (piem., standartnovirzi) un, ja iespējams, minot arī:

a) gaisa plūsmas ātrumu inhalācijas iekārtā;

b) gaisa temperatūru un mitrumu;

c) nominālo koncentrāciju (inhalācijas iekārtā ievadītais pārbaudāmās vielas kopējais daudzums, kas izdalīts ar gaisa daudzumu);

d) nesējvielas tipu, jā tādu izmanto;

e) faktisko vielas koncentrāciju inhalācijas zonā;

f) daļiņu vidējo lielumu (vajadzības gadījumā),

— izmantotās devas (jānorāda arī nesējviela, ja tādu izmanto) un koncentrācijas,

— dati par audzēju biežumu atkarībā no dzimuma, devas un audzēju tipa,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši; tas attiecas arī uz papildu grupu,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas,

— toksiskās iedarbības vai citas iedarbības raksturojums,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— oftalmoloģijas dati,

— barības patēriņš un ķermeņa svara izmaiņas,

— hematoloģiskie izmeklējumi un to rezultāti,

— klīniskās bioķīmijas izmeklējumi un to rezultāti (arī urīnanalīzes rezultāti, ja tādi ir),

— autopsijas rezultāti,

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde un izmantotās metodes,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

TOKSICITĀTES IETEKME UZ VIENAS PAAUDZES REPRODUKTĪVO FUNKCIJU

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcijas**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Vairākas grupas vīriešu un sieviešu kārtas dzīvnieku saņem pārbaudāmo vielu dažādās devās. Tēviņi to saņem augšanas stadijā un vismaz viena pilna spermatoģenēzes cikla laikā (kas pelēm ilgst apmēram 56 dienas un žurkām – 70 dienas), lai noskaidrotu pārbaudāmās vielas kaitīgo ietekmi uz spermatoģenēzi.

Vecākpaaudzes (P) mātītes to saņem vismaz divu pilnu estrālo ciklu laikā, lai noskaidrotu pārbaudāmās vielas kaitīgo ietekmi uz šo ciklu. Tad dzīvniekus pāro. Pārbaudāmo vielu pārošanās laikā saņem abu dzimumu dzīvnieki, bet vēlāk to saņem tikai mātītes grūtniecības un zīdīšanas laikā.

Ja izmanto inhalācijas testu, metodei būs vajadzīgi pielāgojumi.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Veselus un jaunus pieaugušus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma dzīvniekus pieradina pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā.

Pārbaudāmo vielu ieteicams pievienot barībai vai dzeramajam ūdenim. Var izmantot arī citus aplikācijas veidus. Pārbaudāmo vielu izmēģinājuma laikā visi dzīvnieki saņem pēc vienādas shēmas. Ja izmanto šķīdinātāju vai citas piedevas, kas atvieglo pārbaudāmās vielas ievadīšanu vajadzīgajā devā, ir jāpārliecinās, ka tie nav toksiski.

Vielu ievada septiņas dienas nedēļā.

Izmēģinājumu dzīvnieki

Dzīvnieku sugas izvēle

Parasti priekšroku dod žurkām vai pelēm. Izmanto veselus dzīvniekus, ar kuriem iepriekš nav veikti nekādi izmēģinājumi. Šim nolūkam neder dzīvnieku līnijas ar pazeminātu vaislību. Izmēģinājumu dzīvniekiem norāda sugu, līniju, dzimumu, svaru un/vai vecumu.

Pienācīgai reproduktīvo spēju novērtēšanai jāveic pētījumi ar abu dzimumu dzīvniekiem. Visus izmēģinājumu un kontroles dzīvniekus izmanto pēc atšķiršanas no mātes.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Katrā apstrādes un kontroles grupā jābūt pietiekamam dzīvnieku skaitam, lai iegūtu ap 20 grūsnām mātītēm pirmsatnešanās stadijā.

Šādā veidā var nodrošināt pietiekamā daudzumā grūsnas mātītes un mazuļus, lai varētu statistiski novērtēt vielas ietekmi uz P paaudzes dzīvnieku reproduktīvajām spējām, grūsnību un mātišķo dzīvnieku uzvedību, kā arī uz F_1 pēcnācēju zīšanu, augšanu un attīstību no aizmešanās līdz atšķiršanai.

Testa apstākļi

Barību un ūdeni dzīvnieki saņem *ad libitum*. Grūsnas mātītes īsi pirms atnešanās ievieto atsevišķos, šim nolūkam paredzētos būros, vajadzības gadījumā nodrošina materiālu midzeņa ierīkošanai.

Izmantotās devas

Jābūt vismaz trim izmēģinājumu grupām un vienai kontroles grupai. Ja pārbaudāmo vielu ievada kopā ar šķīdinātāju, kontroles dzīvnieki saņem maksimālo izmantoto šķīdinātāja daudzumu. Ja pārbaudāmās vielas ietekmē samazinās uztura patēriņš vai tā uzņemšana organismā, var ieviest kontroles grupu, kas saņem līdzīgu uztura daudzumu. Ja to pieļauj pārbaudāmās vielas fizikālās/ķīmiskās vai bioloģiskās īpašības, jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska vecākdzīvniekiem (P), bet kas neveicina mirstību. Jāizvēlas tāda(s) vidēji lielā(s) deva(s), lai pārbaudāmās vielas izraisītā toksicitāte būtu minimāla, un tāda mazākā deva, lai tās kaitīgā ietekme uz vecākdzīvniekiem un pēcnācējiem nebūtu pamanāma. Ja pārbaudāmo vielu ievada ar zondes palīdzību vai kapsulās, tās deva jāizvēlas atkarībā no katra dzīvnieka ķermeņa svara un to katru nedēļu pielāgo ķermeņa svara izmaiņām. Devas, ko saņem mātītes grūsnības laikā, var aprēķināt pēc to ķermeņa svara tieši pirms izmēģinājuma vai grūsnības 6. dienā.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Ja maztoksiska viela, kuras deva ir vismaz 1 000 mg/kg, nekādi neiespaido dzīvnieku reproduktīvās spējas, tās turpmāka pārbaude, izmantojot citas devas, nav vajadzīga. Ja iepriekšējie pētījumi rāda, ka lielākā deva izteikti toksiski iedarbojas uz mātītēm, bet negatīvi neietekmē auglību, tās turpmāka pārbaude, izmantojot citas devas, nav vajadzīga.

Testa norise

Aplikācijas shēma

Vecākpaaudzes (P) tēviņi sāk katru dienu saņemt pārbaudāmo vielu pēc atšķiršanas un vismaz pēc piecu dienu aklimatizēšanās, kad tie ir aptuveni 5-9 nedēļas veci. Žurkas turpina saņemt vielu 10 nedēļu laikā pirms pārošanās (peles – 8 nedēļas). Tēviņus nokauj un izmeklē tūlīt pēc pārošanās perioda beigām vai arī turpina tiem dot pārbaudāmo vielu, lai vajadzības gadījumā no tiem iegūtu vēl vienu metienu; tādā gadījumā tos nokauj un izmeklē īsi pirms izmēģinājuma beigām. Vecākpaaudzes (P) mātītes sāk saņemt pārbaudāmo vielu pēc vismaz piecu dienu aklimatizēšanās un turpina to saņemt vēl vismaz divas nedēļas pirms pārošanās. P mātītes turpina katru dienu saņemt vielu visā trīs nedēļu garajā pārošanās laikā, grūsnības laikā un vēlāk līdz F_1 pēcteču atšķiršanai. Vielas ievadīšanas shēmu var koriģēt, ja ir pieejama papildu informācija par pārbaudāmo vielu, piemēram, par tās metabolisko aktivāciju vai bioakumulāciju.

Dzīvnieku pārošana

Pētot toksicitātes ietekmi uz reproduktīvo funkciju, var izmantot pārošanas shēmu 1:1 (viens tēviņš un viena mātīte) vai 1:2 (viens tēviņš un divas mātītes).

Ja izmanto shēmu 1:1, mātīte paliek kopā ar tēviņu, līdz tā kļūst grūsna, vai kamēr nav pagājušas trīs nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūtniecību sāk skaitīt no dienas, kad mātītei makstī konstatē embolu vai spermu.

Ja pārošanās neizdodas, dzīvniekus pārbauda, lai noteiktu varbūtējās neauglības cēloņus. Var izmēģināt papildu pārošanos ar citu tēviņu, kura vaislība ir pierādīta, veikt reproduktīvo orgānu mikroskopisko izmeklēšanu, kā arī pārbaudīt estrālo ciklu vai spermatoģenēzi.

Metienu lielums

Pētot auglību pēc pārbaudāmās vielas aplikācijas, dzīvniekiem ļauj netraucēti laist pasaulē pēcnācējus un tos audzināt līdz atšķiršanas brīdim.

Ja tomēr jāsamazina mazuļu skaits metienā, to iesaka veikt šādi. Starp 1. un 4. dienu pēc atnešanās mazuļu skaitu katrā metienā var samazināt, pēc iespējas atstājot tajā četrus vīrišķos un četrus sievišķos mazuļus. Ja vīrišķo un sievišķo mazuļu skaits neļauj atstāt pa četriem katra dzimuma īpatņiem katrā metienā, to var samazināt daļēji (piemēram, atstājot 5 tēviņus un 3 mātītes). Mazuļu skaitu nevar samazināt, ja metienā ir mazāk par 8 mazuļiem.

Dzīvnieku novērošana

Visu izmēģinājuma laiku katru dzīvnieku vismaz vienreiz dienā novēro. Reģistrē acīmredzamas izmaiņas uzvedībā, grūtas vai novēlotas atnešanās gadījumus un toksiskuma pazīmes, kā arī nāves gadījumus. Pirms pārošanās un pārošanās laikā katru dienu var noteikt barības patēriņu. Pēc atnešanās, kā arī zīdīšanas laikā barības patēriņš (un ūdens patēriņš, ja pārbaudāmo vielu pievieno dzeramajam ūdenim) ir jānosaka tajā pašā dienā, kad nosaka metiena svaru. P tēviņi un mātītes jānosver pirmajā vielas aplikācijas dienā un tad ik pēc nedēļas. Novērojumu rezultātus protokolē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.

Grūtniecības ilgumu skaita no grūtniecības "nulles dienas". Katru metienu, tiklīdz iespējams, apskata uzreiz pēc atnešanās, reģistrējot mazuļu skaitu un dzimumu, nedzīvi piedzimušos, dzīvi piedzimušos un acīmredzamas anomālijas.

Nedzīvos mazuļus un mazuļus, kas nokauti 4. dienā, uzglabā un pārbauda tiem iespējamos defektus. Dzīvos mazuļus pārskaita un visu metienu kopā, kā arī katru mazuli atsevišķi nosver nākamajā rītā pēc atnešanās, tad 4. un 7. dienā, bet vēlāk ik pēc nedēļas, kamēr turpinās izmēģinājums. Mātītei un pēcnācējiem reģistrē visas novērotās kroplības vai uzvedības traucējumus.

Patoloģiskās izmaiņas

Autopsija

P paaudzes dzīvnieki pēc nokaušanas vai pēc nāves izmēģinājuma laikā makroskopiski jāizmeklē, reģistrējot jebkuras anatomiskas anomālijas vai patoloģiskas izmaiņas, īpašu uzmanību pievēršot reproduktīvās sistēmas orgāniem. Defektus meklē arī mirušiem un mirstošiem mazuļiem.

Histopatoloģija

Visiem P dzīvniekiem izņem un uzglabā olnīcas, dzemdi, maksti, sēkliniekus, sēklinieku piedēkļus, sēklas pūslīšus, priekšdziedzeri, koagulācijas dziedzeri, hipofīzi un mērķorgānu(s) tālākai izmeklēšanai ar mikroskopu. Ja šie orgāni nav iepriekš izpētīti pēc vairākkārtējas devas ievadīšanas, tos mikroskopiski izmeklē visiem dzīvniekiem pēc lielākās devas aplikācijas un kontroles dzīvniekiem, kā arī izmēģinājuma laikā mirušiem dzīvniekiem, ja to var izdarīt.

Orgānus, kuros šiem dzīvniekiem novēro patoloģiskas izmaiņas, pārbauda arī visiem pārējiem *P* dzīvniekiem. Šajā gadījumā mikroskopiski jāizmeklē visi audi ar acīmredzamām patoloģiskām izmaiņām. Kā jau minēts iedaļā par dzīvnieku pārošanu, mikroskopiski var izmeklēt arī reproduktīvās sistēmas orgānus tiem dzīvniekiem, kuru auglība ir apšaubīta.

2. IEGŪTIE DATI

Datus var apkopot tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, auglīgo tēviņu skaitu, grūsno mātīšu skaitu, patoloģisko izmaiņu tipus un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katra tipa izmaiņām.

Ja iespējams, visi skaitliskie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru vispāratzītu statistikas metodi.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotā suga/līnija,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī par reproduktīvajām spējām, grūtniecību un dzīvotspēju,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši līdz paredzētajam nokaušanas brīdim vai līdz izmēģinājuma beigām,

— tabula, kurā norādīts katra metiena svars, mazuļu vidējais svars un atsevišķu mazuļu svars izmēģinājuma beigās,

— toksiska vai cita iedarbība uz reproduktīvajām spējām, pēcnācējiem un postnatālo attīstību,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— dati par P dzīvnieku ķermeņa svaru,

— autopsijas rezultāti,

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

TOKSICITĀTES IETEKME UZ DIVU PAAUDŽU REPRODUKTĪVO FUNKCIJU

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcijas**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Pārbaudāmo vielu dažādās devās saņem vairākas grupas vīriešu un sieviešu kārtas dzīvnieku. Vecākpaaudzes (P) tēviņi saņem pārbaudāmo vielu augšanas stadijā un vismaz viena pilna spermatoģenēzes cikla laikā (kas pelēm ilgst apmēram 56 dienas un žurkām – 70 dienas), lai noskaidrotu tās kaitīgo ietekmi uz spermatoģenēzi.

Vecākpaaudzes (P) mātītes to saņem vismaz divu pilnu estrālo ciklu laikā, lai noskaidrotu pārbaudāmās vielas kaitīgo ietekmi uz šo ciklu. Tad dzīvniekus pāro. Pārbaudāmo vielu pārošanās laikā saņem abu dzimumu dzīvnieki, bet vēlāk to saņem tikai mātītes grūtniecības un zīdīšanas laikā. F_1 pēcnācēji pēc atšķiršanas turpina saņemt pārbaudāmo vielu visu laiku, kamēr tie aug, pārojas un rada F_2 pēcnācējus, līdz F_2 pēcnācēju atšķiršanas brīdim. Ja izmanto inhalācijas testu, metodei būs vajadzīgi pielāgojumi.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Veselus, jaunus dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās. Vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma vecākpaaudzes (P) dzīvniekus sāk pieradināt pie dzīvošanas un barošanas apstākļiem, kādi būs izmēģinājuma laikā. Pārbaudāmo vielu ieteicams pievienot barībai vai dzeramajam ūdenim. Var izmantot arī citus aplikācijas veidus. Visu izmēģinājuma laiku pārbaudāmā viela dzīvniekiem jāsaņem pēc vienādas shēmas. Ja izmanto šķīdinātāju vai citu piedevu, kas atvieglo pārbaudāmās vielas saņemšanu vajadzīgajā devā, ir jāpārliecinās, ka tie nav toksiski. Vielu ievada septiņas dienas nedēļā.

Izmēģinājumu dzīvnieki – sugas izvēle

Parasti priekšroku dod žurkām vai pelēm.

Izmanto veselus P dzīvniekus, ar kuriem iepriekš nav veikti nekādi izmēģinājumi. Nav ieteicams izmantot dzīvnieku līnijas ar pazeminātu vaislību. Izmēģinājumu dzīvniekiem norāda sugu, līniju, dzimumu, svaru un/vai vecumu.

Pienācīgai reproduktīvo spēju novērtēšanai izmanto abu dzimumu dzīvniekus. Visus izmēģinājumu un kontroles dzīvniekus izmanto pēc atšķiršanas no mātes.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Katrā apstrādes un kontroles grupā jābūt pietiekamam dzīvnieku skaitam, lai iegūtu ap 20 grūsnām mātītēm pirmsatnešanās stadijā. Šādā veidā var nodrošināt pietiekamā daudzumā grūsnas mātītes un mazuļus, lai varētu statistiski novērtēt vielas ietekmi uz reproduktīvo funkciju, grūsnību un mātišķo dzīvnieku uzvedību, kā arī F_1 pēcnācēju zīšanu, augšanu un attīstību no aizmešanās brīža līdz dzimumgatavībai un to pēcnācēju (F_2) attīstību līdz atšķiršanas brīdim.

Testa apstākļi

Barību un ūdeni dzīvnieki saņem *ad libitum*. Grūsnas mātītes īsi pirms atnešanās ievieto atsevišķos šim nolūkam paredzētos būros, vajadzības gadījumā nodrošina materiālu midzeņa ierīkošanai.

Izmantotās devas

Jābūt vismaz trim apstrādes grupām un vienai kontroles grupai. Ja pārbaudāmo vielu ievada kopā ar šķīdinātāju, kontroles dzīvnieki saņem maksimālo izmantoto šķīdinātāja daudzumu. Ja pārbaudāmās vielas ietekmē samazinās uztura patēriņš vai tā uzņemšana organismā, var ieviest kontroles grupu, kas saņem līdzīgu uztura daudzumu. Ja to pieļauj pārbaudāmās vielas fizikālās/ķīmiskās vai bioloģiskās īpašības, jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska vecākdzīvniekiem (P), bet kas neveicina mirstību. Jāizvēlas tāda(s) vidēji lielā(s) deva(s), lai pārbaudāmās vielas izraisītā toksicitāte būtu minimāla, un tāda mazākā deva, lai tās kaitīgā ietekme uz vecākdzīvniekiem un pēcnācējiem nebūtu pamanāma. Ja pārbaudāmo vielu ievada ar zondes palīdzību vai kapsulās, to izvēlas atkarībā no katra dzīvnieka ķermeņa svara un katru nedēļu pielāgo ķermeņa svara izmaiņām. Devas, ko saņem mātītes grūtniecības laikā, var aprēķināt pēc to ķermeņa svara tieši pirms izmēģinājuma vai grūsnības 6. dienā.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Ja maztoksiska viela, kuras deva ir vismaz 1000 mg/kg, nekādi neietekmē dzīvnieku reproduktīvās spējas, var uzskatīt, ka tās turpmāka pārbaude, izmantojot citas devas, nav vajadzīga. Ja iepriekšējie pētījumi rāda, ka lielākā deva izteikti toksiski iedarbojas uz mātītēm, bet negatīvi neietekmē auglību, tās turpmāka pārbaude, izmantojot citas devas, nav vajadzīga.

Testa norise

Aplikācijas shēma

Vecākpaaudzes (P) tēviņiem sāk katru dienu saņemt pārbaudāmo vielu pēc atšķiršanas un vismaz piecu dienu aklimatizēšanās, kad tie ir aptuveni 5-9 nedēļas veci. Žurkas turpina saņemt vielu 10 nedēļu laikā pirms pārošanās (peles – 8 nedēļas). Tēviņus nokauj un izmeklē tūlīt pēc pārošanās perioda beigām vai arī turpina tiem dot pārbaudāmo vielu, lai vajadzības gadījumā no tiem iegūtu vēl vienu metienu; tādā gadījumā tos nokauj un izmeklē īsi pirms izmēģinājuma beigām.

Vecākpaaudzes (P) mātītes sāk saņemt pārbaudāmo vielu pēc vismaz piecu dienu aklimatizēšanās un turpina to saņemt vismaz vēl divas nedēļas pirms pārošanās. P mātītes turpina katru dienu saņemt vielu visā trīs nedēļas garajā pārošanās laikā, grūtniecības laikā un vēlāk līdz F_1 pēcteču atšķiršanai. Vielas aplikācijas shēmu var koriģēt, ja ir pieejama papildu informācija par pārbaudāmo vielu, piemēram, par tās metabolisko aktivāciju vai bioakumulāciju.

F dzīvnieki saņem pārbaudāmo vielu, sākot no atšķiršanas brīža līdz nokaušanai.

Dzīvnieku pārošana

Pētot toksicitātes ietekmi uz reproduktīvo funkciju, var izmantot pārošanas shēmu 1:1 (viens tēviņš un viena mātīte) vai 1:2 (viens tēviņš un divas mātītes).

Ja izmanto shēmu 1:1, mātīte paliek kopā ar tēviņu, līdz tā kļūst grūsna, vai kamēr nav pagājušas trīs nedēļas. Katru rītu mātītēm pārbauda spermas vai embola klātbūtni makstī. Grūtniecību sāk skaitīt no dienas, kad mātītei makstī konstatē embolu vai spermu. Ņemot vērā spermatoģenēzes iestāšanās laiku, F_1 pēcnācējus nevajadzētu pārot, kamēr tie nav sasnieguši vismaz 11 (pelēm) vai 13 (žurkām) nedēļu vecumu. Pirms F_1 pēcnācēju pārošanas no katra metiena pēc nejaušības principa izvēlas vienu tēviņu un vienu mātīti krustošanai ar cita metiena mazuli grupā, kas saņem to pašu vielas devu, lai iegūtu F_2 paaudzi. F_1 tēviņus un mātītes, ko neizmanto pārošanai, nokauj pēc atšķiršanas.

Ja pārošanās neizdodas, dzīvniekus pārbauda, lai noteiktu varbūtējās neauglības cēloņus. Var izmēģināt papildu pārošanos ar citu tēviņu, kura vaislība ir pierādīta, reproduktīvo orgānu mikroskopisko izmeklēšanu, kā arī pārbaudīt estrālo ciklu vai spermatoģenēzi.

Metienu lielums

Pētot auglību pēc pārbaudāmās vielas aplikācijas, dzīvniekiem ļauj netraucēti laist pasaulē savus pēcnācējus un tos audzināt līdz atšķiršanas brīdim.

Ja tomēr jāsamazina mazuļu skaits metienā, to iesaka veikt šādi. Starp 1. un 4. dienu pēc atnešanās mazuļu skaitu katrā metienā var samazināt, pēc iespējas atstājot tajā četrus vīrišķos un četrus sievišķos mazuļus. Ja vīrišķo un sievišķo mazuļu skaits neļauj atstāt pa četriem katra dzimuma īpatņiem katrā metienā, to var samazināt daļēji (piemēram, atstājot 5 tēviņus un 3 mātītes). Mazuļu skaitu nevar samazināt, ja metienā ir mazāk par 8 mazuļiem. Tādā pašā veidā var samazināt F_2 metienu lielumu.

Dzīvnieku novērošana

Visu izmēģinājuma laiku katru dzīvnieku vismaz vienreiz dienā novēro. Reģistrē acīmredzamas izmaiņas uzvedībā, grūtas vai novēlotas atnešanās gadījumus un toksiskuma pazīmes, arī nāves gadījumus. Pirms pārošanās un pārošanās laikā katru nedēļu var noteikt barības patēriņu. Ja vēlas, grūtniecības laikā barības patēriņu var noteikt arī katru dienu. Pēc atnešanās un zīdīšanas laikā barības patēriņu nosaka tajā pašā dienā, kad nosaka metienu svaru. Vecākpaaudzes (P un F_1) dzīvnieki jānosver pirmajā aplikācijas dienā un tad ik pēc nedēļas. Novērojumu rezultātus protokolē atsevišķi par katru pieaugušo dzīvnieku.

Grūtniecības ilgumu skaita no grūtniecības "nulles dienas". Katru metienu, tiklīdz iespējams, apskata uzreiz pēc atnešanās, reģistrējot mazuļu skaitu un dzimumu, nedzīvi piedzimušos, dzīvi piedzimušos un acīmredzamas anomālijas.

Nedzīvos mazuļus un mazuļus, kas nokauti 4. dienā, uzglabā un pārbauda tiem iespējamos defektus. Dzīvos mazuļus pārskaita un visu metienu kopā un katru mazuli atsevišķi nosver nākamajā rītā pēc atnešanās, tad 4. un 7. dienā, bet vēlāk ik pēc nedēļas, kamēr turpinās izmēģinājums. Mātītei un pēcnācējiem reģistrē visas novērotās kroplības un uzvedības traucējumus.

Patoloģiskas izmaiņas

Autopsija

Visus pieaugušos P un F_1 dzīvniekus nokauj pēc to reproduktīvo spēju novērtēšanas. F_1 pēcnācējus, ko neizmanto pārošanai, un F_2 pēcnācējus nokauj pēc atšķiršanas.

Visus vecākdzīvniekus (P un F_1) nokaušanas vai nāves iestāšanās brīdī izmēģinājuma laikā makroskopiski izmeklē, reģistrējot jebkuras anatomiskas anomālijas vai patoloģiskas izmaiņas, īpašu uzmanību pievēršot reproduktīvās sistēmas orgāniem. Defektus meklē arī mirušiem un mirstošiem mazuļiem.

Histopatoloģija

Visiem P un F_1 dzīvniekiem izņem un uzglabā olnīcas, dzemdi, dzemdes kaklu, maksti, sēkliniekus, sēklinieku piedēkļus, sēklas pūslīšus, koagulācijas dziedzerus, priekšdziedzeris, hipofīzi un iedarbības mērķorgānu(s), tālākai izmeklēšanai ar mikroskopu. Ja šie orgāni nav iepriekš izpētīti pēc vairākkārtējas devas aplikācijas, to mikroskopiski izmeklē visiem P un F_1 dzīvniekiem pēc lielākās devas aplikācijas un kontroles dzīvniekiem, kas izvēlēti pārošanai un, ja iespējams, arī izmēģinājumā laikā mirušiem dzīvniekiem. Orgānus, kuros šiem dzīvniekiem novēro patoloģiskas izmaiņas, pārbauda arī dzīvniekiem, kas saņēmuši citas devas. Šajā gadījumā mikroskopiski jāizmeklē visi audi ar acīmredzamām patoloģiskām izmaiņām. Kā jau minēts iedaļā par dzīvnieku pārošanu, mikroskopiski var izmeklēt arī reproduktīvās sistēmas orgānus dzīvniekiem, kuru auglība ir apšaubīta.

2. **IEGŪTIE DATI**

Rezultātu apstrāde

Datus var apkopot tabulā, norādot dzīvnieku skaitu katrā izmēģinājumu grupā testa sākumā, grūsno dzīvnieku skaitu, patoloģisko izmaiņu tipus un dzīvnieku procentuālo īpatsvaru ar katru izmaiņu tipu.

Ja iespējams, visi skaitliskie rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru vispāratzītu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotā suga/līnija,

— dati par toksiskajām reakcijām atkarībā no dzimuma un devas, arī par reproduktīvajām spējām, grūtniecību un dzīvotspēju,

— nāves iestāšanās brīdis izmēģinājuma laikā vai norāde, ka dzīvnieki ir izdzīvojuši,

— tabula, kurā norādīts katra metiena svars, mazuļu vidējais svars un atsevišķu mazuļu svars izmēģinājuma beigās,

— toksiska vai cita iedarbība uz reproduktīvajām spējām, pēcnācējiem un postnatālo attīstību,

— atsevišķu saindēšanās simptomu parādīšanās brīdis un to tālākā attīstība,

— dati par pārošanai izvēlēto P un F_1 dzīvnieku ķermeņa svaru,

— autopsijas rezultāti,

— sīks histopatoloģisko izmeklējumu apraksts,

— rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

TOKSIKOKINĒTIKA

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcijas

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Pārbaudāmo vielu ievada, izmantojot attiecīgo aplikācijas veidu. Atkarībā no pētījuma mērķa šo vielu noteiktā laikā posmā var ievadīt vienreiz vai atkārtoti vienai vai vairākām izmēģinājumu dzīvnieku grupām. Pēc tam atkarībā no pētījuma veida pārbaudāmo vielu un/vai tās metabolītus nosaka ķermeņa šķidrumos, audos un/vai izdalījumos.

Pētījumus var veikt, izmantojot "iezīmētu" vai "neiezīmētu" testa vielu. Ja izmanto iezīmētu pārbaudāmo vielu, tā jāiezīmē tā, lai iegūtu pēc iespējas vairāk informācijas par savienojuma pārvērtību gaitu.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Veselus un jaunus pieaugušos dzīvniekus vismaz piecas dienas pirms izmēģinājuma sāk pieradināt pie laboratorijas apstākļiem. Dzīvniekus pirms izmēģinājuma pēc nejaušības principa sadala apstrādes grupās. Īpašos gadījumos izmanto pavisam jaunus, grūsnus vai jau iepriekš apstrādātus dzīvniekus.

Testa apstākļi

Izmēģinājumu dzīvnieki

Toksikokinētikas izpēti var veikt ar vienu vai vairākām piemērotām dzīvnieku sugām, ņemot vērā to, kādu sugu dzīvnieki jau ir izmantoti vai tiks izmantoti citos toksikoloģiskajos pētījumos ar šo vielu. Ja izmanto grauzējus, to svara svārstības izmēģinājuma laikā nedrīkst pārsniegt ± 20 % no vidējā svara.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Pārbaudot vielas absorbciju un ekskrēciju, katrā grupā, kas saņem vienādu devu, sākotnēji jābūt četriem dzīvniekiem. Dzīvnieku dzimumam nav lielas nozīmes, lai gan atsevišķos gadījumos jāpārbauda abu dzimumu dzīvnieki. Ja reakcija atšķiras atkarībā no dzimuma, tad jāpārbauda pa četriem katra dzimuma dzīvniekiem. Ja pētījumos neizmanto grauzējus, dzīvnieku skaits var būt mazāks.

Pētot vielas izplatīšanos audos, sākotnējais grupas lielums ir atkarīgs no tā, cik dzīvnieku jānokauj katrā konkrētā laika sprīdī un cik bieži tas jādara.

Pētot vielas metabolismu, dzīvnieku skaits ir atkarīgs no konkrēta pētījuma mērķiem.

Izmantojot vairākkārtējas devas un dažādus termiņus, grupas lielums ir atkarīgs no termiņu skaita un no tā, cik bieži dzīvnieki jānokauj; jebkurā gadījumā grupā nevar būt mazāk par diviem dzīvniekiem. Jābūt pietiekamam dzīvnieku skaitam, lai atkarībā no apstākļiem varētu pienācīgi noteikt pārbaudāmās vielas un/vai tās metabolītu koncentrācijas pieaugumu, stabilizēšanos un/vai sarukšanu.

Izmantotās devas

Ja vielu ievada tikai vienreiz, jābūt vismaz divām dažādām devām. Jāizvēlas tāda mazākā deva, kas nav toksiska, un tāda lielākā deva, kas ietekmē toksikokinētikas parametrus vai kurai piemīt toksiska iedarbība.

Ja vielu ievada atkārtoti, parasti pietiek ar mazāko devu, lai gan dažreiz nākas izmantot arī lielāko devu.

Ievadīšanas veids

Toksikokinētikas pētījumos izmanto to pašu aplikācijas veidu un, attiecīgi, to pašu šķīdinātāju, kas jau bijis vai tiks izmantots citos toksicitātes pētījumos. Parasti pārbaudāmo vielu noteiktā laika posmā ievada vairākām izmēģinājumu dzīvnieku grupām perorāli, ar zondes palīdzību, pievieno uzturam, uztriepj uz ādas vai izmanto inhalācijas testu. Pārbaudāmo vielu var ievadīt arī intravenozi, lai salīdzinātu tās absorbcijas ātrumu atkarībā no aplikācijas veida. Turklāt šādi var iegūt noderīgu informāciju par vielas izplatīšanos organismā tūlīt pēc intravenozās ievadīšanas.

Jāpatur prātā šķīdinātāja un pārbaudāmās vielas mijiedarbības iespējamība. Jāpievērš uzmanība tam, ka pārbaudāmās vielas absorbcija, to ievadot caur zondi vai kopā ar uzturu, var atšķirties, kā arī tam, ka tās deva rūpīgi jāizvēlas, it īpaši tad, ja pārbaudāmo vielu pievieno uzturam.

Novērošanas periods

Dzīvniekus katru dienu novēro un reģistrē toksiskuma pazīmes un citus svarīgus klīniskos simptomus, arī to parādīšanās laiku, smaguma pakāpi un ilgumu.

Testa norise

Pēc izmēģinājumu dzīvnieku nosvēršanas tiem attiecīgā veidā ievada pārbaudāmo vielu. Vajadzības gadījumā pārbaudāmo vielu dzīvniekiem ievada pēc badošanās.

Absorbcija

Ievadītās vielas absorbcijas ātrumu un apmērus var noteikt ar dažādām metodēm, arī izmantojot etalongrupas ([1]), piemēram,

— nosakot pārbaudāmās vielas un/vai tās metabolītu daudzumu izdalījumos, proti, urīnā, fekālijās, izelpotā gaisā, un to atlikumu ķermenī,

— salīdzinot bioloģisko iedarbību (piemēram, akūtās toksicitātes noteikšana) uz izmēģinājumu, kontroles un/vai etalongrupas dzīvniekiem,

— salīdzinot nieru izvadītās vielas un/vai tās metabolītu daudzumu izmēģinājumu grupās un etalongrupās,

— aprēķinot platību zem līknes, kas raksturo pārbaudāmās vielas un/vai tās metabolītu koncentrāciju plazmā atkarībā no laika, un salīdzinot to ar etalongrupas datiem.

([1]) Etalongrupa ir dzīvnieku grupa, kam pārbaudāmo vielu ievada citādā veidā, kas nodrošina devas pilnīgu bioloģisko pieejamību.

Izplatīšanās organismā

Pašlaik pastāv divi paņēmieni, kā var analizēt vielas izplatīšanos organismā, kuri ir izmantojami arī abi reizē:

— noderīgus kvalitatīvus datus var iegūt, izmantojot visa ķermeņa autoradiogrāfiju,

— kvantitatīvus datus var iegūt, nokaujot dzīvniekus dažādos termiņos pēc vielas aplikācijas un nosakot pārbaudāmās vielas un/vai tās metabolītu koncentrāciju un daudzumu audos un orgānos.

Izvadīšana no organisma

Pētot vielas izvadīšanu no organisma, ņem urīna, fekāliju un izelpotā gaisa paraugus, bet atsevišķos gadījumos arī žulti. Pārbaudāmās vielas un/vai tās metabolītu daudzumu šajos izdalījumos nosaka dažādos laikos pēc aplikācijas, kamēr tiks izvadīti 95 % no ievadītās devas, bet ne ilgāk kā 7 dienas.

Īpašos gadījumos izmēģinājumu dzīvniekiem zīdīšanas laikā nosaka pārbaudāmās vielas koncentrāciju pienā.

Vielas metabolisms

Lai noteiktu vielas metabolisma intensitāti un īpatnības, ar piemērotām metodēm analizē bioloģiskus paraugus. Jānoskaidro metabolītu struktūra un jānorāda attiecīgie vielmaiņas ceļi, ja iepriekšējos toksikoloģiskajos pētījumos nav rastas atbildes uz šiem jautājumiem. Vielmaiņas ceļu noskaidrošanai var lieti noderēt izmēģinājumi *in vitro*.

Sīkāku informāciju par vielas toksicitātes saistību ar tās metabolismu var iegūt no bioķīmijas pētījumiem, piemēram, pētot tās ietekmi uz metabolisko fermentu sistēmām, endogēno neolbaltumvielu sulfhidrila savienojumu deplēciju un vielas saistīšanos ar makromolekulām.

2. IEGŪTIE DATI

Iegūtos datus atkarībā no pētījuma veida apkopo tabulā, vajadzības gadījumā pievienojot arī grafikus un diagrammas. Ja vajadzīgs, katrai izmēģinājumu grupai norāda vidējās vērtības un statistiskās svārstības atkarībā no laika, devas, audiem un orgāniem. Ar attiecīgām metodēm nosaka absorbcijas pakāpi, kā arī izvadītās vielas daudzumu un izvadīšanas ātrumu. Pēc vielas metabolisma izpētes ir jānorāda identificēto metabolītu struktūra un iespējamie vielmaiņas ceļi.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Atkarībā no pētījuma veida testa ziņojumā, ja iespējams, jāiekļauj šādas ziņas:

— dzīvnieku suga, līnija, izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs,

— iezīmēto vielu raksturojums, ja tās izmanto,

— izmantotās devas un laika intervāls starp devām,

— aplikācijas veids(-i) un izmantotie šķīdinātāji,

— toksiska iedarbība un citi novērotie iedarbības veidi,

— metodes pārbaudāmās vielas un/vai tās metabolītu noteikšanai bioloģiskos paraugos, arī izelpotā gaisā,

— tabulā(s) apkopoti mērījumu rezultāti atkarībā no devas, ievadīšanas režīma, laika, audiem un orgāniem,

— dati par vielas absorbciju un izvadīšanu laika gaitā,
— metodes vielas metabolītu raksturošanai un noteikšanai bioloģiskos paraugos,
— bioķīmiskās metodes vielas metabolisma noteikšanai,
— iespējamie vielmaiņas ceļi,
— rezultātu iztirzājums,
— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

MUTAGENITĀTES NOTEIKŠANA KOPĀ AR KANCEROGENITĀTES PRIEKŠNOVĒRTĒJUMU

GĒNU MUTĀCIJAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ŠŪNĀS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Gēnu mutāciju noteikšanai, ko inducē ķīmiski aģenti pēc metaboliskās aktivācijas vai bez tās, var izmantot dažādus haploīdus un diploīdus rauga (*Saccharomyces cerevisiae*) celmus.

Šim nolūkam izmanto tādas haploīdu celmu mutāciju noteikšanas sistēmas, kas ļauj kvantitatīvi noteikt turpvērsto mutāciju no sarkaniem adenīnatkarīgiem mutantiem (*ade*-1, *ade*-2) uz divkārši adenīnatkarīgiem baltiem mutantiem, kā arī selektīvas sistēmas, piemēram, rezistences inducēšana pret kanavanīnu un cikloheksimīdu.

Visplašāk pārbaudītā atpakaļvērsto mutāciju sistēma ir haploīdais celms XV 185-14C, kas satur *ochre* nonsensmutācijas *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 un *trp* 5-48, kuru reversiju var panākt ar bāzu nomaiņas mutagēniem, kas inducē sait-specifiskas mutācijas vai mutācijas *ochre* supresorgēnā. XV 185-14C satur arī ģenētisko marķieri *his* 1-7, kas ir misensmutācija, kuras reversiju var galvenokārt panākt ar mutāciju citā saitā, un iezīmētājgēnu *hom* 3-10, kas revertējams ar fāzes nobīdes mutagēniem.

No diploīdiem *S. cerevisiae* celmiem plaši izmanto tikai celmu D_7, kas ir homozigots pēc *ilv* 1-92.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Pārbaudāmo vielu un kontrolvielu šķīdumus attiecīgajā šķīdinātājā gatavo īsi pirms izmēģinājuma. Ja izmanto organiskos savienojumus, kas nešķīst ūdenī, tos izšķīdina tādā organiskā šķīdinātājā kā etanols, acetons vai dimetilsulfoksīds (DMSO), kuru koncentrācija nedrīkst pārsniegt 2 tilp %. Šķīdinātājs galīgajā koncentrācijā nedrīkst ievērojami ietekmēt šūnu dzīvotspēju un vairošanos.

Metaboliskā aktivācija

Šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, pievienojot tām piemērotu eksogēnu metaboliskās aktivācijas sistēmu, vai bez tās.

Visplašāk izmanto no grauzēju aknām iegūtu postmitohondriālo frakciju kopā ar kofaktoru, kas iepriekš apstrādāta ar fermentus inducējošiem aģentiem. Metabolisko aktivāciju var panākt, izmantojot arī citas sugas, audus, postmitohondriālās frakcijas vai metodes.

Testa apstākļi

Izmantotie rauga celmi

Gēnu mutāciju pētījumos visbiežāk izmanto haploīdo celmu XV 185-14C un diploīdo celmu D_7. Šim nolūkam der arī citi rauga celmi.

Barotnes

Izdzīvojušo un mutanto šūnu skaita noteikšanai izmanto piemērotas barotnes.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Vienlaikus jāizmanto pozitīvā kontrole, kontrole bez apstrādes un kontrole ar šķīdinātāju. Katras konkrētas mutācijas noteikšanai izmanto pozitīvo kontroli ar piemērotām vielām.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Pārbaudāmās vielas diapazons aptver vismaz piecas atšķirīgas koncentrācijas. Toksiskām vielām izvēlas tādu lielāko koncentrāciju, lai izdzīvotu vismaz 5-10 % šūnu. Vielas, kas samērā slikti šķīst ūdenī, pārbauda koncentrācijā, kas ir tuvu to šķīdības robežai, izmantojot piemērotu metodi. Netoksiskām vielām, kas pilnībā šķīst ūdenī, lielāko koncentrāciju nosaka katrā atsevišķā gadījumā.

Inkubācijas apstākļi

Mikrobioloģiskās plates inkubē 4-7 dienas, tumsā, 28-30 °C temperatūrā.

Spontāno mutāciju biežums

Jāizmanto subkultūras, kam spontāno mutāciju biežums nepārsniedz pieņemto normu.

Replikātu skaits

Reģistrējot prototrofus, kas radušies gēnu mutāciju rezultātā, katras koncentrācijas pārbaudei un šūnu dzīvotspējas noteikšanai izmanto vismaz trīs replikātus. Ja izmēģinājumā izmanto tādu ģenētisko marķieri kā *hom* 3-10, kam ir pazemināts mutāciju biežums, plašu skaits ir jāpalielina, lai iegūtu statistiski nozīmīgus datus.

Testa norise

S. cerevisiae celmu apstrādi parasti veic šķidrā barotnē, kad šūnas atrodas stacionārajā fāzē vai vairošanās fāzē. Sākotnēji izmēģinājumus veic ar šūnām vairošanās fāzē (1-5 × 10^7 šūnu/ml): uz ne vairāk kā 18 stundām tās pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai 28-37 °C temperatūrā, pastāvīgi kratot; šajā laikā, atkarībā no apstākļiem, tām var vajadzīgā daudzumā pievienot metaboliskās aktivācijas sistēmu. Pēc apstrādes šūnas centrifugē, skalo un iesēj piemērotā barotnē. Pēc inkubācijas pārbauda izdzīvojušo šūnu skaitu un inducēto gēnu mutāciju biežumu.

Ja pirmajā izmēģinājumā iegūst negatīvus rezultātus, tad izmēģinājums jāatkārto ar šūnām stacionārajā fāzē. Ja pirmajā izmēģinājumā iegūst pozitīvus rezultātus, tie jāapstiprina vēl vienā neatkarīgā izmēģinājumā.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot reģistrēto koloniju skaitu, mutantu skaitu, šūnu dzīvotspēju un mutācijas biežumu. Visi šie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā izmēģinājumā. Iegūtie dati jāizvērtē, izmantojot piemērotas statistikas metodes.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotais mikroorganismu celms,

— testa apstākļi (šūnas stacionārajā fāzē vai vairošanās fāzē, barotņu sastāvs, inkubācijas temperatūra un ilgums, metaboliskās aktivācijas sistēma),

— aplikācijas shēma (izmantotās koncentrācijas, norise un ilgums, temperatūra, pozitīvā un negatīvā kontrole),

— reģistrēto koloniju skaits, mutantu skaits, šūnu dzīvotspēja un mutāciju biežums, vajadzības gadījumā devas/iedarbības attiecība, datu statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

MITOTISKĀ REKOMBINĀCIJA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ŠŪNĀS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Mitotisko rekombināciju *Saccharomyces cerevisiae* šūnās var novērot gan starp gēniem (vai visbiežāk starp gēnu un centromēru), gan viena gēna ietvaros. Pirmajā gadījumā to dēvē par mitotisko krustmiju, un tās rezultātā rodas reciprokie produkti, bet otrajā gadījumā šis process nav reciprokāls, un to dēvē par gēnu konversiju. Par krustmiju parasti liecina tas, ka heterozigotiem celmiem rodas recesīvas homozigotas kolonijas vai sektori, savukārt uz gēnu konversiju norāda prototrofu revertantu parādīšanās auksotrofos heteroalēlos celmos, kas vienā gēnā satur divas dažādas bojātas alēles. Mitotiskās gēnu konversijas noteikšanai visplašāk izmanto tādus rauga celmus kā D_4 (kas ir heteroalēls pēc *ade* 2 un *trp* 5), D_7 (heteroalēls pēc *trp* 5), BZ_{34} (heteroalēls pēc *arg* 4) un JD1 (heteroalēls pēc *his* 4 un *trp* 5). Mitotisko krustmiju, kuras rezultātā rodas sarkani vai rozā sektori, var noteikt rauga celmam D_5 vai D_7 (tos izmanto arī mitotiskās gēnu konversijas un atgriezenisko mutāciju noteikšanai *ilv* 1-92 gēnā); abi šie celmi ir heteroalēli pēc komplementējošajām *ade* 2 alēlēm.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Pārbaudāmo vielu un kontrolvielu vai standartvielu šķīdumus piemērotā šķīdinātājā gatavo īsi pirms izmēģinājuma. Ja izmanto organiskos savienojumus, kas nešķīst ūdenī, tos izšķīdina tādā organiskā šķīdinātājā kā etanols, acetons vai dimetilsulfoksīds (DMSO), kuru koncentrācija nedrīkst pārsniegt 2 tilp %. Šķīdinātājs galīgajā koncentrācijā nedrīkst ievērojami ietekmēt šūnu dzīvotspēju un vairošanos.

Metaboliskā aktivācija

Šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, gan pievienojot tām piemērotu eksogēnu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Visplašāk izmanto no grauzēju aknām iegūtu postmitohondriālo frakciju kopā ar kofaktoru, kas iepriekš apstrādāta ar fermentus inducējošiem aģentiem. Metabolisko aktivāciju var panākt, izmantojot arī citas sugas, audus, pēcmitohondriālās frakcijas vai metodes.

Testa apstākļi

Izmantotie rauga celmi

Visplašāk izmanto diploīdos celmus D_4, D_5, D_7 un JD1. Šim nolūkam var izmantot arī citus rauga celmus.

Barotnes

Izdzīvojušo šūnu skaita un mitotiskās rekombinācijas biežuma noteikšanai izmanto piemērotas barotnes.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Vienlaikus jāizmanto pozitīvā kontrole, kontrole bez apstrādes un kontrole ar šķīdinātāju. Katras konkrētas rekombinācijas noteikšanai izmanto pozitīvo kontroli ar piemērotām vielām.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Pārbaudāmās vielas diapazons aptver vismaz piecas atšķirīgas koncentrācijas. Cita starpā jāņem vērā tādi faktori kā citotoksicitāte un šķīdība. Viela vismazākajā koncentrācijā nedrīkst nomākt šūnu dzīvotspēju. Toksiskām vielām izvēlas tādu lielāko koncentrāciju, lai izdzīvotu vismaz 5-10 % šūnu. Vielas, kas samērā slikti šķīst ūdenī, pārbauda koncentrācijā, kas ir tuvu to šķīdības robežai, izmantojot piemērotu metodi. Netoksiskām vielām, kas pilnībā šķīst ūdenī, lielāko koncentrāciju nosaka katrā atsevišķā gadījumā.

Pārbaudāmās vielas iedarbībai, kas ilgst līdz 18 stundām, var pakļaut šūnas stacionārajā fāzē vai vairošanās fāzē. Bet, ja izmanto garāku ekspozīcijas laiku, mikroskopiski jāpārbauda, vai rauga kultūrās neveidojas sporas, jo tad izmēģinājuma rezultāti būs nederīgi.

Inkubācijas apstākļi

Mikrobioloģiskās plates inkubē 4-7 dienas, tumsā, 28-30 °C temperatūrā. Plates, ko izmanto sarkano un rozā homozigoto sektoru noteikšanai, kuri veidojas krustmijas rezultātā, pirms to skaitīšanas vēl vienu vai divas dienas glabā ledusskapī (ap 4 °C), ļaujot attīstīties attiecīgās krāsas kolonijām.

Spontānās mitotiskās rekombinācijas biežums

Jāizmanto subkultūras, kurām spontānās mitotiskās rekombinācijas biežums nepārsniedz pieņemto normu.

Replikātu skaits

Reģistrējot prototrofus, kas radušies mitotiskās gēnu konversijas rezultātā, katras koncentrācijas pārbaudei un šūnu dzīvotspējas noteikšanai izmanto vismaz trīs replikātus. Reģistrējot recesīvo homozigotismu pēc mitotiskās krustmijas, izmantoto plašu skaits ir jāpalielina, lai sasniegtu vajadzīgo koloniju daudzumu.

Testa norise

S. cerevisiae celmu apstrādi parasti veic šķidrā barotnē, kad šūnas atrodas stacionārajā fāzē vai vairošanās fāzē. Pirmos izmēģinājumus veic ar šūnām vairošanās fāzē. 1-5 × 10^7 šūnu/ml uz ne ilgāk kā 18 stundām pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai 28-37 °C temperatūrā, pastāvīgi kratot; šajā laikā, atkarībā no apstākļiem, tām var vajadzīgā daudzumā pievienot metaboliskās aktivācijas sistēmu.

Pēc apstrādes šūnas centrifugē, skalo un iesēj piemērotā barotnē. Pēc inkubācijas pārbauda izdzīvojušo šūnu skaitu un inducētās mitotiskās rekombinācijas biežumu.

Ja pirmajā izmēģinājumā iegūst negatīvus rezultātus, tad izmēģinājums jāatkārto ar šūnām stacionārajā fāzē. Ja pirmajā izmēģinājumā iegūst pozitīvus rezultātus, tie jāapstiprina neatkarīgā izmēģinājumā.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot reģistrēto koloniju skaitu, rekombinantu skaitu, izdzīvojušo šūnu skaitu un rekombinācijas biežumu.

Šie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā izmēģinājumā.

Iegūtie dati jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotais mikroorganismu celms,

— testa apstākļi (šūnas stacionārajā fāzē vai vairošanās fāzē, barotņu sastāvs, inkubācijas temperatūra un ilgums, metaboliskās aktivācijas sistēma),

— aplikācijas shēma (izmantotās koncentrācijas, norise un ilgums, temperatūra, pozitīvā un negatīvā kontrole),

— reģistrēto koloniju skaits, rekombinantu skaits, izdzīvojušo šūnu skaits un rekombinācijas biežums, vajadzības gadījumā devas/iedarbības attiecība, datu statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

GĒNU MUTĀCIJU NOTEIKŠANA ZĪDĪTĀJU ŠŪNĀS *IN VITRO*

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcija

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Ķīmiski inducētu mutāciju noteikšanai var izmantot zīdītāju šūnu kultūras. Plaši izmanto tādas šūnu līnijas kā peļu limfomas šūnas L5178Y un Ķīnas kāmja šūnu līnijas CHO un V-79. Šīs šūnu līnijas visbiežāk izmanto mutāciju noteikšanai timidīnkināzes (TK), hipoksantīnguanīnfosforiboziltransferāzes (HPRT) ([1]) un Na^+/K^+ ATFāzes lokusā. TK un HPRT mutāciju sistēmas kalpo bāzes pāru mutāciju, fāzes nobīdes mutāciju un nelielu delēciju noteikšanai, Na^+/K^+ sistēmu izmanto tikai bāzes pāru mutāciju noteikšanai.

Šūnas, kas turpvērstās $TK^+ \longrightarrow TK^-$ mutācijas dēļ nespēj sintezēt timidīnkināzi, ir rezistentas pret bromdezoksiuridīnu (BrdU), fluordezoksiuridīnu (FdU) vai trifluortimidīnu (TFT), jo šie antimetabolīti netiek iesaistīti nukleotīdos ar "alternatīvās" fermentu sistēmas – timidīnkināzes – starpniecību; šūnu vielmaiņai vajadzīgo nukleotīdu trūkumu var kompensēt tikai *de novo* sintēze. Tomēr timidīnkināzes klātbūtnē BrdU, FdU vai TFT iesaistās nukleotīdu struktūrā, kā rezultātā tiek nomākta šūnu vielmaiņa un rodas citotoksicitāte. Tādējādi mutantās šūnas spēj vairoties BrdU, FdU vai TFT klātbūtnē, bet normālās šūnas, kas satur timidīnkināzi, to nespēj. Līdzīgā veidā notiek to šūnu atlase, kas nespēj sintezēt HPRT, jo tās ir rezistentas pret 8-azaguanīnu (AG) vai 6-tioguanīnu (TG). Šūnas ar izmainītu Na^+/K^- ATFāzi izdzīvo, jo tās ir rezistentas pret vabaīnu.

Citotoksicitāti nosaka, pētot pārbaudāmās vielas ietekmi uz koloniju veidošanas spēju (klonēšanas efektivitāti) šūnu kultūrās vai to augšanas ātrumu. Mutāciju biežumu pārbauda, iesējot noteiktu skaitu šūnu barotnē, kas satur selektīvo aģentu mutanto šūnu atpazīšanai, kā arī barotnē bez selektīvā aģenta izdzīvojušo šūnu noteikšanai. Pēc atbilstoša inkubācijas perioda skaita kolonijas. Mutāciju biežumu aprēķina pēc mutanto koloniju skaita, ņemot vērā izdzīvojušo šūnu skaitu.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Šūnas

Šim nolūkam ir izmantojamas dažādas šūnu līnijas. Tostarp L5178Y subkloni, CHO vai V-79 šūnas, kas uzrāda izteiktu jutīgumu pret ķīmiskiem mutagēniem, augstu klonēšanas efektivitāti un zemu spontāno mutāciju biežumu. Šīm šūnām var regulāri pārbaudīt kariotipa noturīgumu, kā arī jāpārbauda, vai tās nav kontaminētas ar mikoplazmu. Var izmantot arī citus šūnu tipus, ja vien var dokumentāri apliecināt, ka tie der ķīmiski inducētu mutāciju noteikšanai.

([1]) Agrāk lietotais saīsinājums – HGPRT.

Barotne

Jāizmanto piemērota barotne un inkubācijas apstākļi (piemēram, temperatūra, inkubācijas trauki, CO_2 koncentrācija un gaisa mitrums). Barotnes un serumi jāizvēlas atkarībā no eksperimentā izmantojamām selektīvajām sistēmām un šūnu tipa.

Pārbaudāmā viela

Pārbaudāmās vielas pirms šūnu apstrādes var pievienot barotnei vai izšķīdināt piemērotā šķīdinātajā. Šķīdinātājs galīgajā koncentrācijā nedrīkst nomākt šūnu dzīvotspēju vai vairošanās ātrumu.

Metaboliskā aktivācija

Šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, gan pievienojot tām piemērotu zīdītāju izcelsmes eksogēnu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Bet ja izmanto šūnu tipus, kam piemīt iekšējā metaboliskā aktivitāte, šīs metaboliskās sistēmas aktivitātei un īpašībām jābūt saderīgām ar pārbaudāmās ķīmiskās vielas klasi.

Testa apstākļi

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Katrā eksperimentā jāparedz pozitīvā kontrole, gan izmantojot savienojumu, kam nav vajadzīga iepriekšēja metaboliskā aktivācija, gan tādu, kam tā ir vajadzīga; tāpat jāizmanto arī negatīvā kontrole (ar šķīdinātāju).

Šeit ir minētas vielas, kuras, piemēram, var izmantot kā pozitīvo kontroli:

— vielas, kurām nav vajadzīga aktivācija:

  — etilmetānsulfonāts,

  — hikantons,

— vielas, kurām ir vajadzīga aktivācija:

  — 2-acetilaminofluorēns,

  — 7,12-dimetilbenzantracēns,

  — N-nitrozodimetilamīns.

Ja iespējams, kā pozitīvo kontroli var izmantot vielu no tās pašas ķīmiskās klases, pie kuras pieder pārbaudāmā viela.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Pārbaudāmā viela jāizmanto vairāku koncentrāciju diapazonā. Vielai šajā koncentrāciju diapazonā jāuzrāda toksicitāte, kas ir atkarīga no koncentrācijas, turklāt lielākās koncentrācijas ietekmē šūnu izdzīvošanas pakāpei jābūt zemai, bet mazākās koncentrācijas ietekmē tai jābūt apmēram tādai pašai kā negatīvajā kontrolē.

Vielas, kas samērā slikti šķīst ūdenī, pārbauda koncentrācijā, kas ir tuvu to šķīdības robežai, izmantojot piemērotu metodi. Netoksiskām vielām, kas pilnībā šķīst ūdeni, lielāko pārbaudāmo koncentrāciju nosaka katrā atsevišķā gadījumā.

Testa norise

Šūnu skaits katrā paraugā ir atkarīgs no spontāno mutāciju biežuma; parasti iesaka izmantot dzīvotspējīgu šūnu skaitu, kas 10 reižu pārsniedz spontāno mutāciju biežuma apgriezti proporcionālo lielumu.

Jāizvēlas pienācīgs šūnu ekspozīcijas laiks, parasti pietiek ar divām līdz piecām stundām. Šūnām, kuru iekšējā metaboliskā aktivitāte nav pietiekami augsta, pārbaudāmo vielu pievieno gan kopā ar piemērotu metabolisma aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Beidzoties ekspozīcijas laikam, šūnas skalo, lai tiktu vaļā no pārbaudāmās vielas, un kultivē tālāk, lai noteiktu to dzīvotspēju un lai varētu izpausties mutantais fenotips.

Beidzoties laikam, kas vajadzīgs, lai varētu puslīdz optimāli izpausties inducēto mutantu fenotips, šūnas audzē barotnē gan ar selektīvo aģentu, gan bez tā un tad nosaka mutantu skaitu un šūnu dzīvotspēju.

Visi iegūtie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā eksperimentā.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulas veidā. Mutāciju indukcijas un šūnu izdzīvošanas dati attiecībā uz pārbaudāmās vielas iedarbību un kontroles kultūrām jānorāda atsevišķi par katru plati. Jānorāda arī vidējais koloniju skaits katrā platē un standartnovirze. Mutāciju biežums jānorāda kā mutantu skaits attiecībā pret izdzīvojušo šūnu skaitu. Izdzīvojušo šūnu skaitu un klonēšanas efektivitāti norāda procentos no kontroles lieluma.

Dati jāizvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotā šūnu līnija, šūnu kultūru skaits, šūnu kultivēšanas paņēmieni,

— testa apstākļi (barotņu sastāvs, CO_2 koncentrācija, pārbaudāmās vielas koncentrācija, izmantotais šķīdinātājs, inkubācijas temperatūra, inkubācijas laiks, fenotipiskās ekspresijas ilgums (vajadzības gadījumā, arī iesēto šūnu un subkultūru skaits), barotnes atjaunošanas grafiks, ekspozīcijas ilgums, šūnu slāņa blīvums ekspozīcijas laikā, zīdītāju izcelsmes metaboliskās aktivācijas sistēmas tips, pozitīvā un negatīvā kontrole, izmantotais selektīvais aģents),

— devu izvēles pamatojums,

— metode dzīvotspējīgo šūnu un mutanto šūnu skaita noteikšanai,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

DNS BOJĀJUMI UN TO REPARĀCIJA – DNS ĀRPUSFĀZES SINTĒZE – ZĪDĪTĀJU ŠŪNAS *IN VITRO*

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcija

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Ar šo metodi DNS ārpusfāzes sintēzes (DĀS) noteikšanai pēta DNS reparatīvo sintēzi pēc tam, kad no DNS ir izgriezts un izņemts fragments, kas satur ķīmisku vai fizikālu aģentu inducētus bojājumus. Šim nolūkam izmanto ar tritiju iezīmētu timidīnu (^{3}H-TdR), kas iekļaujas DNS struktūrā zīdītāju šūnās, kuras tajā brīdī atrodas ārpus šūnas cikla S fāzes. DNS molekulās uzņemto ^{3}H-TdR apstrādātajās šūnās var noteikt, izmantojot autoradiogrāfiju vai šķidrumscintilāciju metodi (ŠSM). Zīdītāju šūnu kultūras, ja tie nav primārie žurku hepatocīti, apstrādā ar pārbaudāmo vielu, gan pievienojot tām eksogēno metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. DĀS mērījumiem var izmantot arī *in vivo* sistēmas.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Pārbaudāmās vielas un kontroles vai standartvielas pievieno barotnei vai izšķīdina/suspendē piemērotā šķīdinātājā/vidē un tad atšķaida ar barotni tālākai izmantošanai izmēģinājumā. Šķīdinātājs galīgajā koncentrācijā nedrīkst nomākt šūnu dzīvotspēju.

Šim nolūkam var izmantot primārās žurku hepatocītu un cilvēku limfocītu kultūras vai pastāvīgās šūnu līnijas (piemēram, cilvēku diploīdos fibroblastus).

Šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, gan pievienojot tām piemērotu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās.

Testa apstākļi

Šūnu kultūru skaits

Katra līknes punkta iegūšanai autoradiogrāfijas vajadzībām izmanto vismaz divas šūnu kultūras un sešas kultūras (vai mazāk, ja to var zinātniski pamatot) DĀS noteikšanai ar ŠSM.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Katrā izmēģinājumā, gan veicot metabolisko aktivāciju, gan bez tās, vienlaikus jāparedz pozitīvā un negatīvā (bez pārbaudāmās vielas un/vai ar šķīdinātāju) kontrole.

Kā pozitīvās kontroles piemēru žurku hepatocītu kultūrā var minēt 7,12-dimetilbenzantracēnu (7,12-DMBA) vai 2-acetilaminofluorēnu (2-AAF). Ja izmanto pastāvīgās šūnu līnijas, kā pozitīvās kontroles paraugu gan autoradiogrāfijas, gan ŠSM pētījumiem bez metaboliskās aktivācijas var minēt 4-nitrohinolīn-N-oksīdu (4-NHO); ja izmanto metaboliskās aktivācijas sistēmas, šādas pozitīvās kontroles piemērs ir N-dimetilnitrozamīns.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Pārbaudāmā viela jāizmanto tādā koncentrāciju diapazonā, kas ļautu veikt vajadzīgos mērījumus. Vielai lielākajā koncentrācijā jāuzrāda citotoksiska iedarbība. Savienojumus, kas samērā slikti šķīst ūdenī, pārbauda koncentrācijā, kas ir tuvu to šķīdības robežai. Netoksiskām ķīmiskām vielām, kas pilnībā šķīst ūdeni, lielāko pārbaudāmo koncentrāciju nosaka katrā atsevišķā gadījumā.

Šūnas

Šūnu kultūras kultivē piemērotā barotnē, nodrošinot vajadzīgo CO_2 koncentrāciju, temperatūru un mitrumu. Pastāvīgās šūnu līnijas regulāri pārbauda, lai nodrošinātos pret mikoplazmas kontamināciju.

Metaboliskā aktivācija

Metaboliskās aktivācijas sistēmu neizmanto ar primāro hepatocītu kultūrām. Pastāvīgās šūnu līnijas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, gan pievienojot tām piemērotu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās.

Testa norise

Šūnu kultūru sagatavošana

Pastāvīgās šūnu līnijas iegūst no pamatkultūrām (piemēram, tripsinizējot vai nokratot šūnas), kuras iesēj inkubācijas traukos vajadzīgā blīvumā un kultivē 37 °C temperatūrā.

Īslaicīgas žurku hepatocītu kultūras iegūst, ļaujot tikko izdalītiem hepatocītiem piemērotā barotnē piestiprināties pie substrāta.

Cilvēka limfocītu kultūras iegūst, izmantojot attiecīgās metodes.

Kultivēto šūnu apstrāde ar pārbaudāmo vielu

Primārie žurku hepatocīti

Tikko izdalītiem žurku hepatocītiem uz noteiktu laiku pievieno pārbaudāmo vielu kopā ar barotni, kas satur ^{3}H-TdR. Beidzoties ekspozīcijas laikam, barotni nolej, bet šūnas skalo, apstrādā ar fiksatoru un žāvē. Priekšmetstikliņus iemērc autoradiogrāfijas emulsijā (var izmantot arī "novelkamo emulsijas kārtu"), eksponē, attīsta, krāso un novērtē.

Pastāvīgās šūnu līnijas un limfocīti

Autoradiogrāfijas metodes. Vajadzīgo laika sprīdi šūnu kultūras pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai un pēc tam apstrādā ar ^{3}H-TdR. Ekspozīcijas laiks ir atkarīgs no vielas īpašībām, metabolisko sistēmu aktivitātes un šūnu tipa. Lai noteiktu DĀS maksimumu, ^{3}H-TdR pievieno reizē ar pārbaudāmo vielu vai dažas minūtes vēlāk, sākoties ekspozīcijas laikam. Kuru no divām iespējām izvēlēties, ir atkarīgs no tā, vai pārbaudāmā viela mijiedarbojas ar ^{3}H-TdR. Lai varētu atšķirt DĀS no DNS puskonservatīvās replikācijas, pēdējo var nomākt, piemēram, izmantojot bezarginīna barotni ar zemu seruma saturu vai pievienojot barotnei oksiurīnvielu.

DĀS mērījumi ar ŠSM. Pirms pievienot pārbaudāmo vielu, ir jābloķē šūnu pāreja S fāzē, kā tas aprakstīts iepriekš, un tad šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, kā norādīts autoradiogrāfijas metodes aprakstā. Beidzoties inkubācijas laikam, no šūnām izdala DNS un nosaka kopējo DNS saturu, kā arī uzņemtā ^{3}H-TdR daudzumu.

Jāpatur prātā, ka, ja saskaņā ar iepriekš minēto metodi izmanto cilvēka limfocītus bez stimulācijas, DNS puskonservatīvā replikācija nav jānomāc.

Analīze

Noteikšana ar autoradiogrāfijas metodi

Nosakot DĀS šūnu kultūrā, neņem vērā šūnu kodolus S fāzē. Pārbaudot katru vielas koncentrāciju, veic vismaz 50 šūnu analīzi. Priekšmetstikliņus pirms skaitīšanas apzīmē ar šifru. Katram priekšmetstikliņam pēc nejaušības principa izskata vairākus citu no cita tālu esošus laukumus. Citoplazmā uzņemtā ^{3}H-TdR daudzumu nosaka, katras saskaitītās šūnas citoplazmā pārbaudot trīs laukumus, kuri pēc lieluma līdzinās šūnas kodolam.

Noteikšana ar ŠSM

Veicot DĀS noteikšanu ar ŠSM, katras koncentrācijas pārbaudei un kontroles grupā izmanto pietiekamu šūnu kultūru skaitu.

Visi šie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā izmēģinājumā.

2. IEGŪTIE DATI

Iegūtie dati jāapkopo tabulā.

2.1. Noteikšana ar autoradiogrāfijas metodi

Atsevišķi jāreģistrē citoplazmā iekļautā ^{3}H-TdR daudzums un graudiņu skaits virs šūnas kodola.

Citoplazmā ietvertā ^{3}H-TdR daudzuma sadalījumu un graudiņu skaita sadalījumu uz vienu kodolu var raksturot ar vidējās, mediālās un modālās vērtības palīdzību.

2.2. Noteikšana ar ŠSM

Veicot noteikšanu ar ŠSM, uzņemtā ^{3}H-TdR daudzumu norāda kā dpm/μg DNS. Uzņemtās radioaktivitātes sadalījumu var raksturot ar dpm/μg DNS vidējo vērtību kopā ar standartnovirzi.

Dati jāizvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotās šūnas, šūnu slāņa blīvums un pasāžu skaits ekspozīcijas brīdī, šūnu kultūru skaits,

— šūnu kultivēšanas metodes, norādot barotni, temperatūru un CO_2 koncentrāciju,

— pārbaudāmā viela, šķīdinātājs, to koncentrācija un pamatojums eksperimentā izmantoto koncentrāciju izvēlei,

— metaboliskās aktivācijas sistēmu raksturojums,

— ekspozīcijas shēma,

— pozitīvā un negatīvā kontrole,

— izmantotā autoradiogrāfijas metode,
— paņēmiens, kas izmantots, lai bloķētu šūnu pāreju S fāzē,
— metodes, kas izmantotas DNS izdalīšanai un DNS kopējā satura noteikšanai ar ŠSM,
— ja iespējams, iedarbības atkarība no devas,
— statistiskais novērtējums,
— rezultātu iztirzājums,
— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

MĀSHROMATĪDU APMAIŅAS NOTEIKŠANA *IN VITRO*

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcija

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Metode māshromatīdu apmaiņas (MHA) noteikšanai ļauj īsā laikā reģistrēt DNS reciproko apmaiņu starp divām replicējošās hromosomas māshromatīdām. MHA laikā notiek DNS replikācijas produktu savstarpējā apmaiņa, kas skar acīmredzami homologos lokusus. Apmaiņas process, iespējams, noris, DNS molekulai pārtrūkstot un atkal savienojoties, lai gan tā molekulārais mehānisms ir maz izpētīts. Lai konstatētu MHA, jārod veids, kā atšķirīgi iezīmēt māshromatīdas; to var panākt, divu šūnas ciklu laikā ļaujot šūnām uzņemt bromdezoksiuridīnu (BrdU) hromosomālajā DNS.

Zīdītāju šūnas *in vitro* pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, vajadzības gadījumā vienlaikus pievienojot zīdītāju izcelsmes eksogēnu metaboliskās aktivācijas sistēmu un divu replikācijas ciklu laikā kultivējot tās BrdU saturošā barotnē. Pēc apstrādes ar vārpstveida inhibitoru (piem., kolhicīnu), kas ļauj uzkrāt šūnas mitozes metafāzei līdzīgā stadijā (c- jeb k-metafāze), šūnas savāc un gatavo hromosomu preparātus.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

— Šim nolūkam var izmantot primārās kultūras (piem., cilvēka limfocītus) vai pastāvīgās šūnu līnijas (piem., Ķīnas kāmja olnīcu šūnas). Šūnu līnijas jāpārbauda, lai nodrošinātos pret mikoplazmas kontamināciju.

— Izmanto piemērotas barotnes un ievēro inkubācijas apstākļus (piemēram, temperatūru, inkubācijas traukus, CO_2 koncentrāciju un gaisa mitrumu).

— Pārbaudāmās vielas pirms ekspozīcijas var pievienot barotnei vai izšķīdināt/suspendēt piemērotā šķīdinātājā/nesējvielā. Šķīdinātājs/nesējviela galīgajā koncentrācijā nedrīkst ievērojami nomākt šūnu dzīvotspēju vai vairošanās ātrumu inkubācijas sistēmā, tā ietekmi uz MHA biežumu pārbauda, izmantojot kontroli ar šķīdinātāju.

— Šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai, gan pievienojot tām piemērotu eksogēnu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Savukārt, ja izmanto šūnu tipus, kam piemīt iekšējā metaboliskā aktivitāte, šīs metaboliskās sistēmas aktivitātei un īpašībām jābūt saderīgām ar pārbaudāmās ķīmiskās vielas klasi.

Testa apstākļi

Šūnu kultūru skaits

Viena līknes punkta iegūšanai izmanto vismaz divus šūnu kultūras paraugus.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Katrā eksperimentā jāparedz pozitīvā kontrole, gan izmantojot savienojumu, kam nav vajadzīga metaboliskā aktivācija, gan tādu, kam šāda aktivācija ir vajadzīga; vienlaikus jāizmanto negatīvā kontrole (ar šķīdinātāju).

Šeit ir minētas vielas, kuras var izmantot kā pozitīvo kontroli:

— viela, kurai nav vajadzīga aktivācija:

  — etilmetānsulfonāts,

— viela, kurai vajadzīga aktivācija:

  — ciklofosfamīds.

Vajadzības gadījumā kā papildu pozitīvo kontroli var izmantot vielu no tās pašas ķīmiskās klases, pie kuras pieder pārbaudāmā viela.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Pārbaudāmās vielas diapazons aptver vismaz trīs atšķirīgas koncentrācijas. Vielai lielākajā koncentrācijā jābūt ievērojami toksiskai, bet tā nedrīkst nomākt šūnu replikāciju. Vielas, kas samērā slikti šķīst ūdenī, pārbauda koncentrācijā, kas ir tuvu to šķīdības robežai, izmantojot piemērotu metodi. Netoksiskām vielām, kas pilnībā šķīst ūdeni, lielāko pārbaudāmo koncentrāciju nosaka katrā atsevišķā gadījumā.

Testa norise

Šūnu kultūru sagatavošana

Pastāvīgās šūnu līnijas iegūst no pamatkultūrām (piemēram, tripsinizējot vai nokratot šūnas), tās iesēj tās inkubācijas traukos vajadzīgā blīvumā un kultivē 37 °C temperatūrā. Ja izmanto vienslāņa kultūras, šūnu skaitam katrā inkubācijas traukā jābūt tādam, lai šūnu savākšanas brīdī vienlaidu [šūnu] slānis aizņemtu ne vairāk kā 50 % kultūras platības. Pastāv arī iespēja izmantot suspendētu šūnu kultūras. Cilvēka limfocītu kultūras, izmantojot piemērotas metodes, iegūst no asinīm, kam pievienots heparīns, un inkubē 37 °C temperatūrā.

Šūnu apstrāde

Šūnas eksponenciālajā vairošanās fāzē pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai attiecīgajā ekspozīcijas laikā; parasti pietiek ar 1-2 stundām, lai gan atsevišķos gadījumos ekspozīcijas laiku var pagarināt līdz diviem pilniem šūnas cikliem. Šūnām, kurām nepiemīt pietiekama metaboliskā aktivitāte, pārbaudāmo vielu pievieno gan kopā ar piemērotu metabolisma aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Beidzoties ekspozīcijas laikam, šūnas skalo, lai tiktu vaļā no pārbaudāmās vielas, un divu replikācijas ciklu garumā tās kultivē BrdU klātbūtnē. Pastāv iespēja šūnas vienlaicīgi pakļaut pārbaudāmās vielas un BrdU iedarbībai divu pilnu šūnas ciklu laikā.

Cilvēka limfocītu kultūras apstrādā, kamēr tās atrodas pussinhronā stāvoklī.

Šūnas analizē otrās dalīšanās laikā pēc ekspozīcijas, gādājot par to, lai visjutīgākajās šūnas cikla stadijās tās būtu pakļautas vielas iedarbībai. Kamēr šūnas nav savāktas, visas darbības ar šūnu kultūrām, kurām pievienots BrdU, jāveic tumsā vai nespodrā kvēlspuldžu gaismā, lai mazinātu BrdU saturošās DNS fotolīzi.

Šūnu savākšana

Šūnu kultūras apstrādā ar vārpstveida inhibitoru (piemēram, kolhicīnu) 1-4 stundas pirms to savākšanas. Katru šūnu kultūru atsevišķi savāc un apstrādā, lai vēlāk sagatavotu hromosomu preparātus.

Hromosomu apstrāde un krāsošana

Hromosomu preparātus gatavo pēc citoģenētikas standartmetodēm. Priekšmetstikliņus MHA noteikšanai var krāsot, izmantojot dažādas metodes (piem., fluorescences metodi kopā ar Gīmsa metodi).

Preparātu analīze

Analizējamo šūnu skaits ir atkarīgs no spontānās MHA biežuma kontroles šūnās. Parasti MHA noteikšanai analizē vismaz 25 labi izkliedētas metafāzes no katras šūnu kultūras. Priekšmetstikliņus pirms analīzes apzīmē ar šifru. Kas attiecas uz cilvēka limfocītiem, analizē tikai tās metafāzes, kurās ir 46 centromēras. Pastāvīgo šūnu līniju preparātos analizē tikai metafāzes, kurās centromēru skaits atbilst modālajam skaitam ± 2 centromēras. Jānorāda, vai marķējuma izmaiņas ap centromēru ir uzskatāmas par MHA. Iegūtie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā eksperimentā.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā. Visām apstrādātām šūnu kultūrām un kontroles kultūrām atsevišķi jānorāda MHA biežums katrā metafāzē un MHA biežums uz vienu hromosomu katrā metafāzē.

Iegūtie dati jāizvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotās šūnas, šūnu kultivēšanas paņēmieni,

— testa apstākļi (barotņu sastāvs, CO_2 koncentrācija, pārbaudāmās vielas koncentrācija, izmantotais šķīdinātājs, inkubācijas temperatūra, ekspozīcijas ilgums, izmantotais vārpstas inhibitors, tā koncentrācija un apstrādes ilgums, izmantotā zīdītāju izcelsmes metaboliskās aktivācijas sistēma, pozitīvā un negatīvā kontrole),

— šūnu kultūru skaits uz vienu eksperimentālās līknes punktu,

— hromosomu preparātu izgatavošanas apraksts,

— analizēto metafāžu skaits (atsevišķi dati par katru šūnu kultūru),

— MHA vidējais biežums uz vienu šūnu un uz vienu hromosomu (atsevišķi dati par katru šūnu kultūru),

— MHA uzskaites kritēriji,

— devu izvēles pamatojums,

— vajadzības gadījumā, iedarbības atkarība no devas,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

AR DZIMUMU SAISTĪTO RECESĪVO LETĀLO MUTĀCIJU NOTEIKŠANA *(DROSOPHILA MELANOGASTER)*

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Metode ar dzimumu saistīto recesīvo letālo mutāciju noteikšanai (SLRL tests) ļauj reģistrēt mutāciju (gan punktmutāciju, gan nelielu delēciju) parādīšanos *Drosophila melanogaster* dzimumšūnās. Šim nolūkam pārbauda turpvērstās mutācijas, kas var skart vienu no aptuveni 800 X hromosomas lokusiem, kuri veido gandrīz 80 % no to kopējā skaita X hromosomās. X hromosomā atrodas apmēram piektā daļa no visa haploīdā genoma.

Mutācijas *Drosophila melanogaster* X hromosomā fenotipiski izpaužas tēviņos, kuri ir mutantā gēna nesēji. Ja mutācija ir letāla hemizigotajā stāvoklī, par tās klātbūtni var spriest pēc tā, ka novēro tikai vienu no divām vīrišķo pēcnācēju klasēm, kuras parasti iegūst no heterozigotas mātītes. Uz šiem atzinumiem balstās SLRL tests, kurā izmanto īpaši marķētas un pārveidotas hromosomas.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Ģenētiskais materiāls

Šim nolūkam der tēviņi no labi izpētītas savvaļas tipa populācijas un mātītes no populācijas *Muller-5*. Var izmantot arī citas attiecīgi marķētas mātīšu populācijas, kuru X hromosomas satur vairākas inversijas.

Pārbaudāmā viela

Pārbaudāmās vielas izšķīdina ūdenī. Vielas, kas nešķīst ūdenī, var izšķīdināt vai suspendēt piemērotā šķīdinātājā/nesējvielā (piemēram, etilspirta un *Tween 60* vai *Tween 80* maisījumā), un tad pirms ievadīšanas tās atšķaida ar ūdeni vai fizioloģisko šķīdumu; šim nolūkam nebūtu ieteicams izmantot dimetilsulfoksīdu (DMSO).

Dzīvnieku skaits

Pirms izmēģinājuma jau iepriekš jānosaka tā precizitāte un ticamības pakāpe. Hromosomu skaits, kas jāanalizē pēc vielas aplikācijas, ir lielā mērā atkarīgs no spontāno mutāciju biežuma, ko novēro kontroles grupā.

Ievadīšanas veids

Vielu var ievadīt perorāli, injekcijas veidā vai izmantot gāzes vai tvaikus. Pārbaudāmo vielu var iebarot kopā ar cukura šķīdumu. Vajadzības gadījumā vielas var izšķīdināt 0,7 % NaCl šķīdumā un injicēt tās krūšu vai vēdera apvidū.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Jāizmanto negatīvā (ar šķīdinātāju) un pozitīvā kontrole. Taču, ja attiecīgie kontroles dati jau iegūti iepriekš, var iztikt bez kontroles izmēģinājumiem.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Jāizmanto trīs dažādas koncentrācijas. Iepriekšējai novērtēšanai var izmantot vienu pārbaudāmās vielas koncentrāciju, izvēloties maksimāli pieļaujamo koncentrāciju vai tādu koncentrāciju, kas izraisa toksicitātes simptomus. Ja vielas nav toksiskas, tās izmanto pēc iespējas lielākā koncentrācijā.

Testa norise

Savvaļas tipa tēviņus (3 līdz 5 dienas vecus) pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai un katru atsevišķi sapāro ar vairākām neapaugļotām mātītēm no *Muller-5* populācijas vai no citas attiecīgi marķētas (X hromosomas satur vairākas inversijas) populācijas. Mātītes ik pēc 2-3 dienām aizstāj ar citām neapaugļotām mātītēm, lai būtu aptverts viss dzimumšūnu attīstības cikls. Šo mātīšu pēcnācējiem reģistrē to letāļu biežumu, kuras radušās pēc iedarbības uz nobriedušiem spermatozoīdiem, vidējās vai vēlīnās attīstības stadijas spermatīdiem, agrīnajiem spermatīdiem, spermatocītiem un spermatogonijiem.

Heterozigotās F_1 mātītes, kas iegūtas pēc iepriekš minētās krustošanas, katru atsevišķi (proti, vienā stobriņā pa vienai mātītei) sapāro ar saviem brāļiem. Katru F_2 paaudzes kultūru pārbauda, vai tajā atrodami savvaļas tipa tēviņi. Ja atklājas, ka kultūra radusies no F_1 mātītes, kuras tēvišķajā X hromosomā ir letālais gēns (proti, tajā nenovēro tēviņus ar savvaļas tipa hromosomu), ir jāpārbauda šīs mātītes meitas ar tādu pašu genotipu, lai noskaidrotu letalitātes parādīšanos nākamajās paaudzēs.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā, norādot pārbaudīto X hromosomu skaitu, neauglīgo tēviņu skaitu un letālo mutāciju skaitu pēc katras koncentrācijas iedarbības, kuras novērotas katram apstrādātajam tēviņam pēc katras pārošanās reizes. Norāda arī dažāda lieluma klasteru skaitu uz vienu tēviņu. Šie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā eksperimentā.

SLRL testa rezultāti jāizvērtē ar piemērotu statistikas metodi. Jāizpēta un piemērotā veidā statistiski jāizvērtē tādu recesīvo letālo mutāciju klasteru veidošanās, kas nāk no viena un tā paša tēviņa.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— ģenētiskais materiāls (izmantotās *Drosophila* populācijas vai līnijas, mušiņu vecums, apstrādāto tēviņu skaits, sterilo tēviņu skaits, iegūto F_2 kultūru skaits, F_2 kultūru skaits, kam nav pēcnācēju, hromosomu skaits ar letālajām mutācijām, kas reģistrētas katrā dzimumšūnu attīstības stadijā,

— kritēriji, pēc kuriem nosaka apstrādāto grupu lielumu,

— testa apstākļi (sīks apstrādes un paraugu ņemšanas shēmas apraksts, izmantotās koncentrācijas, toksicitātes dati, negatīvā (ar šķīdinātāju) un pozitīvā kontrole, ja izmanto),

— letālo mutāciju uzskaites kritēriji,

— ja iespējams, jānorāda iedarbības atkarība no devas,

— datu izvērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. Izvērtējums un interpretācija

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

ZĪDĪTĀJU ŠŪNU TRANSFORMĀCIJA *IN VITRO*

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Zīdītāju šūnu kultūras *in vitro* var izmantot ķīmiski inducētu fenotipisko izmaiņu noteikšanai, kuras saista ar ļaundabīgu transformāciju *in vivo*. Šim nolūkam plaši izmanto tādas šūnas kā CH310T ½, SHE, Fišera žurku šūnas, pētot izmaiņas šūnu morfoloģijā, transformācijas perēkļu veidošanos vai spēju vairoties mīkstajā agarā. Retāk izmanto tādas sistēmas, kas ļauj reģistrēt citas fizioloģiskas vai morfoloģiskas izmaiņas pēc ķīmisku kancerogēnu iedarbības. Nevienam *in vitro* pētāmajam parametram nav pierādīta cēloniska sakarība ar vēzi. Dažas eksperimentālās sistēmas var izmantot audzēju promotoru noteikšanai. Par citotoksicitāti var spriest pēc pārbaudāmās vielas ietekmes uz koloniju veidošanos (klonēšanas efektivitāti) šūnu kultūrās vai to vairošanās ātrumu. Citotoksicitātes mērījumi ļauj secināt, ka pārbaudāmās vielas iedarbība ir toksikoloģiski determinēta, taču to nevar visos gadījumos izmantot transformācijas biežuma aprēķināšanai, jo tas dažreiz paredz ilgāku inkubāciju un/vai šūnu atkārtotu izsēšanu.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Šūnas

Atkarībā no transformācijas noteikšanas metodes var izmantot dažādas šūnu līnijas vai primārās šūnu kultūras. Jāpārliecinās, ka izmēģinājumā izmantotās šūnas ļauj novērot noteiktas fenotipiskās izmaiņas pēc zināmu kancerogēnu iedarbības un ka laboratorijā izmantotā metode ir dokumentāri pierādīta par derīgu un uzticamu.

Barotne

Jāizmanto tādas barotnes un izmēģinājuma apstākļi, kas ir saderīgi ar transformācijas noteikšanas metodi.

Pārbaudāmā viela

Pārbaudāmās vielas pirms šūnu apstrādes var pievienot barotnei vai izšķīdināt/suspendēt piemērotā šķīdinātājā/nesējvielā. Šķīdinātājs/nesējviela galīgajā koncentrācijā nedrīkst nomākt šūnu dzīvotspēju, vairošanās ātrumu vai transformācijas biežumu.

Metaboliskā aktivācija

Šūnas pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai gan kopā ar piemērotu metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Turpretī, ja izmanto šūnu tipus, kam piemīt iekšējā metaboliskā aktivitāte, šīs metaboliskās sistēmas aktivitātei un īpašībām jābūt saderīgām ar pārbaudāmās ķīmiskās vielas klasi.

Testa apstākļi

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Katrā eksperimentā jāparedz pozitīvā kontrole, gan izmantojot savienojumu, kam nav vajadzīga iepriekšējā metaboliskā aktivācija, gan tādu, kam tā ir vajadzīga; tāpat jāizmanto negatīvā kontrole (ar šķīdinātāju/nesējvielu).

Šeit ir minētas vielas, kuras var izmantot kā pozitīvo kontroli:

— vielas, kurām nav vajadzīga aktivācija:

  — etilmetānsulfonāts,

  — β-propiolaktons,

— savienojumi, kam ir vajadzīga metaboliskā aktivācija:

  — 2-acetilaminofluorēns,

  — 4-dimetilaminoazobenzols,

  — 7,12-dimetilbenzantracēns.

Ja iespējams, kā papildu pozitīvo kontroli jāizmanto viela no tās pašas ķīmiskās klases, pie kuras pieder pārbaudāmā viela.

Koncentrācija ekspozīcijas laikā

Pārbaudāmā viela jāizmanto vairāku koncentrāciju diapazonā. Vielai šajā koncentrāciju diapazonā jāuzrāda toksicitāte, kas ir atkarīga no koncentrācijas, turklāt lielākās koncentrācijas ietekmē šūnu izdzīvošanai jābūt zemai, bet mazākās koncentrācijas ietekmē tai jābūt apmēram tādai pašai kā negatīvajā kontrolē. Vielas, kas samērā slikti šķīst ūdenī, pārbauda koncentrācijā, kas ir tuvu to šķīdības robežai, izmantojot piemērotu metodi. Netoksiskām vielām, kas pilnībā šķīst ūdenī, lielāko pārbaudāmo koncentrāciju nosaka katrā atsevišķā gadījumā.

Testa norise

Vajadzīgajā laika sprīdī, kas atkarīgs no izmantotās eksperimentālās sistēmas, šūnas pakļauj vielas iedarbībai, un, ja izmanto garāku ekspozīcijas laiku, vielu var ievadīt atkārtoti, vienlaikus apmainot barotni (un vajadzības gadījumā arī metaboliskās aktivācijas sistēmu). Šūnām, kuru iekšējā metaboliskā aktivitāte nav pietiekami augsta, pārbaudāmo vielu pievieno gan kopā ar nepieciešamo metaboliskās aktivācijas sistēmu, gan bez tās. Beidzoties ekspozīcijas laikam, šūnas skalo, lai atbrīvotos no pārbaudāmās vielas, un, ievērojot apstākļus, kas ļauj izpausties transformēto šūnu fenotipam, kultivē tālāk, reģistrējot transformācijas biežumu. Visi iegūtie rezultāti jāapstiprina neatkarīgā eksperimentā.

2. IEGŪTIE DATI

Dati jāapkopo tabulā atkarībā no izmantotās metodes, piemēram, norādot plašu skaitu, plates, kurās novērota transformācija, vai transformēto šūnu skaitu. Vajadzības gadījumā izdzīvojušo šūnu skaitu norāda procentos no attiecīgā skaita kontroles kultūrās un transformācijas biežumu aprēķina kā transformēto šūnu skaitu attiecībā pret izdzīvojušo šūnu skaitu. Dati jāizvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotais šūnu tips, šūnu kultūru skaits, šūnu kultivēšanas paņēmieni,

— testa apstākļi (pārbaudāmās vielas koncentrācija, izmantotais šķīdinātājs/nesējviela, inkubācijas ilgums, ekspozīcijas ilgums un biežums, šūnu slāņa blīvums apstrādes laikā, izmantotās eksogēnās metaboliskās aktivācijas sistēmas tips, pozitīvā un negatīvā kontrole, kontrolējamā fenotipa raksturojums, selektīvā sistēma (ja izmanto), izvēlēto devu pamatojums),

— izmantotā dzīvotspējīgu un transformētu šūnu uzskaites metode,
— statistiskais novērtējums,
— rezultātu iztirzājums,
— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

DOMINANTO LETĀĻU NOTEIKŠANA GRAUZĒJIEM

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Dominantās letāles izraisa embriju vai augļu bojāeju. Dominanto letāļu indukcija ķīmiskas vielas ietekmē norāda uz to, ka šī viela iedarbojas uz izmēģinājumu dzīvnieku ģeneratīvajiem audiem. Parasti uzskata, ka dominantās letāles rodas hromosomu bojājumu (strukturālu un skaitlisku anomāliju) rezultātā. Mātītēm pēc vielas iedarbības embriju bojāeja var iestāties arī toksicitātes ietekmē.

Parasti tēviņus pakļauj pārbaudāmās vielas iedarbībai un tad sapāro ar neapaugļotām mātītēm. Izmantojot secīgus pārošanas intervālus, var atsevišķi pārbaudīt [vielas ietekmi uz] katru dzimumšūnu attīstības stadiju. Par mirstību pēc implantācijas var secināt, ja aprēķina nedzīvo implantu skaita pieaugumu uz vienu mātīti apstrādātajā grupā attiecībā pret šo skaitu kontroles grupā. Mirstību pirms implantācijas var aplēst pēc dzelteno ķermeņu skaita vai salīdzinot implantu kopējo skaitu uz vienu mātīti apstrādes un kontroles grupā. Dominanto letāļu kopējo skaitu veido kopējā mirstība pirms un pēc implantācijas. Aprēķinot dominanto letāļu kopējo skaitu, salīdzina dzīvo implantu skaitu uz vienu mātīti izmēģinājumu grupā ar dzīvo implantu skaitu uz vienu mātīti kontroles grupā. Implantu skaita samazināšanās dažās grupās pēc pārošanās var būt izskaidrojama ar šūnu (t.i., spermatocītu un/vai spermatogoniju) bojāeju.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Pārbaudāmās vielas, ja iespējams, izšķīdina vai suspendē izotoniskā sāls šķīdumā. Ķīmiskas vielas, kas nešķīst ūdenī, var izšķīdināt vai suspendēt piemērotā šķīdinātājā. Izmantotais šķīdinātājs nedrīkst ietekmēt pārbaudāmās vielas iedarbību vai būt toksisks. Izmanto tikko pagatavotus pārbaudāmās vielas šķīdumus vai suspensijas.

Testa apstākļi

Ievadīšanas veids

Parasti pārbaudāmo vielu ievada tikai vienreiz. Pamatojoties uz toksikoloģijas datiem, var veikt atkārtotu apstrādi. Parasti izmanto perorālu intubāciju vai intraperitoniālu injekciju. Var izmantot arī citus aplikācijas veidus.

Izmēģinājumu dzīvnieki

Izmēģinājumos ieteicams izmantot žurkas vai peles. Veselus dzīvniekus, kas pilnībā sasnieguši dzimumgatavību, pēc nejaušības principa sadala kontroles un apstrādes grupās.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Apstrādāto tēviņu skaits ir atkarīgs no analizējamās bioloģiskās pazīmes spontānās mainības biežuma. Izvēloties dzīvnieku skaitu, jau iepriekš jāapsver izmantotās metodes precizitāte un ticamības pakāpe. Piemēram, uzsākot eksperimentu, katrā dzīvnieku grupā, kas saņem vienādu devu, parasti jābūt tādam tēviņu skaitam, lai vienā pārošanās periodā varētu iegūt 30 līdz 50 grūsnu mātīšu.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Parasti katrā izmēģinājumā vienlaikus jāparedz pozitīvā un negatīvā (ar šķīdinātāju) kontrole. Ja tajā pašā laboratorijā nesen iegūti apmierinoši pozitīvās kontroles rezultāti, tos var izmantot jaunajā eksperimentā pozitīvās kontroles vietā. Pozitīvās kontroles vielas ievada samērā nelielā devā (piemēram, *MMS*, intraperitoniāli, 10 mg/kg), lai noteiktu metodes precizitāti.

Izmantotās devas

Parasti izmanto trīs dažādas devas. Jāizvēlas tāda lielākā deva, kas ir toksiska vai kuras ietekmē samazinās dzīvnieku auglība. Atsevišķos gadījumos var pietikt ar vienu lielu devu.

Iedarbīguma robežas noteikšana

Netoksisku vielu testēšanai izmanto 5 g/kg devu, ja to ievada vienreiz, vai 1 g/kg/dienā, ja to ievada atkārtoti.

Testa norise

Pastāv vairākas aplikācijas shēmas. Visbiežāk pārbaudāmo vielu ievada tikai vienreiz. Var izmantot arī citas aplikācijas shēmas.

Katru atsevišķu tēviņu pēc apstrādes secīgi sapāro ar vienu vai divām neapaugļotām un neapstrādātām mātītēm, ievērojot vajadzīgos intervālus. Mātīte paliek kopā ar tēviņu vismaz vienu estrālo ciklu vai līdz brīdim, kad ir notikusi pārošanās, par ko liecina sperma vai embols makstī.

Pārošanās reižu skaits pēc apstrādes ir atkarīgs no aplikācijas shēmas, un tam jāaptver visas dzimumšūnu attīstības stadijas.

Mātītes nonāvē grūtniecības otrajā puslaikā un pārbauda dzemdes saturu, reģistrējot nedzīvo un dzīvo implantu skaitu. Dažreiz pārbauda olnīcas, lai noteiktu dzelteno ķermeņu skaitu.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā, norādot tēviņu skaitu, grūsno mātīšu skaitu, kā arī to mātīšu skaitu, kurām nav iestājusies grūtniecība. Atsevišķi jānorāda katras pārošanās rezultāti kopā ar katra tēviņa un mātītes raksturojumu. Katrai mātītei norāda pārošanās nedēļu, devu, ko saņēmis tēviņs, kā arī dzīvo un nedzīvo implantu skaitu.

Aprēķinot kopējo dominanto letāļu skaitu, salīdzina dzīvo implantu skaitu uz vienu mātīti izmēģinājuma grupā ar dzīvo implantu skaitu uz vienu mātīti kontroles grupā. Lai noteiktu mirstību pēc implantācijas, salīdzina un analīzē dzīvo un nedzīvo implantu attiecību apstrādāto dzīvnieku grupā un kontroles grupā.

Ja atsevišķi reģistrē agrīnas un vēlīnas mirstības gadījumus, šie dati jāiekļauj tabulā. Ja ir aplēsta mirstība pirms implantācijas, tā jānorāda ziņojumā. Mirstību pirms implantācijas var aprēķināt pēc dzelteno ķermeņu un implantu skaita starpības vai pēc implantu vidējā skaita samazinājuma vienā dzemdē, salīdzinot ar kontroles dzīvnieku pārošanās rezultātiem.

Datus izvērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantoto dzīvnieku suga, līnija, vecums un svars, dzīvnieku skaits izmēģinājumu un kontroles grupās pēc dzimuma,

— pārbaudāmā viela, šķīdinātājs, pārbaudītās devas un izvēlēto devu pamatojums, negatīvā un pozitīvā kontrole, toksicitātes dati,

— aplikācijas veids un shēma,

— pārošanās shēma,

— metode veiksmīgas pārošanās noteikšanai,

— dzīvnieku nokaušanas brīdis,

— dominanto letāļu uzskaites kritēriji,

— vajadzības gadījumā, iedarbības atkarība no devas,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

ZĪDĪTĀJU DZIMUMŠŪNU CITOĢENĒTIKA *IN VIVO*

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Ar šo citoģenētikas metodi nosaka strukturālas aberācijas spermatogoniju hromosomās *in vivo*. Šim nolūkam analizē spermatogonijus mitozes stadijā un reģistrē hromatidālās un hromosomālās aberācijas.

Pārbaudāmo vielu attiecīgā veidā ievada zīdītājiem un pēc dažādiem laika intervāliem tos nonāvē un no sēkliniekiem gatavo preparātus. Pirms nokaušanas dzīvniekiem papildus ievada dalīšanās vārpstas inhibitoru, piemēram, kolhicīnu, kas ļauj uzkrāt šūnas, kas atrodas mitozes metafāzei līdzīgā stadijā (c-metafāze). Pēc gaisā žāvētu hromosomu preparātu izgatavošanas tos krāso un analizē mikroskopā.

Noderīgu papildu informāciju var iegūt, analizējot spermatocītus diakinēzes-metafāzes I stadijā un reģistrējot translokācijas multivalentus pēc spermatogoniju cilmes šūnu apstrādes.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Pārbaudāmās vielas izšķīdina izotoniskā sāls šķīdumā. Ja vielas nešķīst ūdenī, tās izšķīdina vai suspendē piemērotā šķīdinātājā. Pārbaudāmās vielas šķīdumam jābūt tikko pagatavotam. Ja izmanto šķīdinātāju, kas atvieglo vajadzīgās devas ievadīšanu, tas nedrīkst reaģēt ar pārbaudāmo vielu vai būt toksisks.

Ievadīšanas veids

Pārbaudāmās vielas parasti ievada tikai vienreiz. Pamatojoties uz toksikoloģijas datiem, var veikt atkārtotu apstrādi. Lai gan atkārtotu apstrādi var veikt tikai tad, ja pārbaudāmā viela nav izteikti citotoksiska attiecība pret spermatogonijiem diferenciācijas stadijā.

Parasti vielas ievada perorāli vai intraperitoniāli. Var izmantot arī citus aplikācijas veidus.

Izmēģinājumu dzīvnieki

Visbiežāk izmanto peles un Ķīnas kāmjus. Var izmantot arī citas zīdītāju sugas.

Izmanto dzimumgatavību sasniegušus dzīvniekus, kurus pēc nejaušības principa sadala apstrādes un kontroles grupās.

Dzīvnieku skaits

Katrā izmēģinājumu un kontroles grupā jābūt vismaz pieciem tēviņiem.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Visos izmēģinājumos vienlaikus jāparedz pozitīvā un negatīvā (ar šķīdinātāju) kontroli.

Pozitīvās kontroles vielas ievada samērā nelielā devā (piemēram, mitomicīns C, intraperitoniāli, 0,3 mg/kg), lai noteiktu metodes precizitāti.

Izmantotās devas

Pārbaudāmo vielu ievada vienreiz, izvēloties maksimāli pieļaujamo devu vai devu, kas ir mēreni citotoksiska. Ja šīs devas ietekmē daudzas šūnas iet bojā, jāizmanto cita, mazāk citotoksiska deva. Ja ir jānosaka, kā vielas iedarbība mainās atkarībā no devas, jāizmanto vismaz trīs devas (piemēram, lai apstiprinātu vāji izteiktu pozitīvu reakciju). Pārbaudot netoksiskas vielas, jāizvēlas pēc iespējas lielāka deva neatkarīgi no tā, vai to ievada vienreiz vai atkārtoti.

Testa norise

Dzīvnieki parasti saņem tikai vienu pārbaudāmās vielas devu. Grupā, kurā dzīvnieki saņem lielāko devu, jāparedz trīs paraugu ņemšanas termiņi. Vidējais paraugu ņemšanas termiņš ir 24 stundas. Tā kā pārbaudāmā viela var ietekmēt šūnas cikla kinētiku, izmanto vienu agrāku un vienu vēlāku paraugu ņemšanas termiņu ar pienācīgu laika atstarpi 6-48 stundu diapazonā. Ja izmanto papildu devas, paraugi jāņem tad, kad šūnas ir sevišķi jutīgas pret vielas iedarbību, bet ja tas nav zināms – 24 stundas pēc apstrādes.

Pastāv arī iespēja izmantot atkārtotas aplikācijas shēmu, nokaujot dzīvniekus tad, kad pēc pēdējās aplikācijas ir pagājušas 24 stundas. Var paredzēt papildu termiņus paraugu ņemšanai 6-24 stundu diapazonā.

Sēklinieku sagatavošana

Pirms spermatogoniju mitozes analīzes dzīvniekiem intraperitoniāli ievada vajadzīgā devā dalīšanās vārpstas inhibitoru, piemēram, kolhicīnu. Pēc tam vajadzīgos termiņos dzīvniekus nokauj. Pelēm šis intervāls var ilgt 3-5 stundas, Ķīnas kāmjiem tas var pārsniegt 5 stundas.

Preparātus žāvē gaisā. Strādājot ar citām sugām, standartmetodei var būt vajadzīgas modifikācijas. Iegūtās šūnu suspensijas apstrādā ar hipotonisku šķīdumu un fiksē. Šūnu suspensiju uzpilina uz priekšmetstikliņiem un krāso. Priekšmetstikliņus, pirms tos analizē mikroskopā, apzīmē ar šifru.

Metafāžu plātņu analīze

Pētot strukturālas hromosomu aberācijas mitozes metafāzē, katram dzīvniekam pārbauda vismaz 100 labi izkliedētas plātnes, kas satur pilnu centromēru skaitu. Bez tam katram dzīvniekam var aprēķināt spermatogoniju mitožu skaita un pirmās un otrās mejozes metafāžu skaita attiecību kopējā paraugā, kas satur 100 dalošās šūnas, lai noteiktu iespējamo citotoksisko iedarbību.

2. **IEGŪTIE DATI**

Dati jāapkopo tabulā. Katram kontroles un izmēģinājumu dzīvniekam atsevišķi norāda visus aberāciju tipus. Katrai grupai norāda arī analizēto šūnu skaitu kopumā un to, cik katrā grupā ir šūnu ar aberācijām. Visiem parametriem nosaka vidējo vērtību un standartnovirzi. Katrai izmēģinājumu un kontroles grupai tabulā norāda spermatogoniju mitožu skaita un pirmās un otrās mitozes metafāžu skaita vidējo attiecību.

Datus novērtē ar piemērotām statistikas metodēm.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

3.1. **Testa ziņojums**

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— tēviņu suga un līnija, tēviņu vecums un svars,

— dzīvnieku skaits katrā izmēģinājumu un kontroles grupā,

— testa apstākļi, sīks apstrādes apraksts, izmantotās devas, šķīdinātāji, izmantotais vārpstas inhibitors,

— analizēto šūnu skaits uz vienu dzīvnieku katrā grupā,

— katram izmēģinājumu un kontroles dzīvniekam norāda novēroto aberāciju tipu un skaitu,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

PEĻU PLANKUMAINĪBAS TESTS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. **Definīcija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. **Standartvielas**

Nav.

1.4. **Metodes būtība**

Ar šo *in vivo* metodi pēta ķīmisku vielu iedarbību uz peļu embrijiem, kas atrodas dažādās attīstības stadijās. Kā mērķšūnas izmanto embriju melanoblastus, kuru gēni kontrolē peļu apmatojuma krāsu. Augošie embriji ir heterozigoti pēc vairākiem gēniem, kas nosaka apmatojuma krāsu. Mutācija šāda gēna dominantajā alelē vai tās zudums melanoblastā (kam pamatā var būt dažādi ģenētiskie mehānismi) noved pie recesīvā fenotipa izpausmes pēcnācējšūnās, kas izpaužas kā atšķirīgas krāsas plankums piedzimušas peles apmatojumā. Šādu plankumainu pēcnācēju skaitu un mutāciju biežumu pēc vielas iedarbības salīdzina ar tiem pašiem rādītājiem pēcnācēju grupā pēc šķīdinātāja iedarbības. Peļu plankumainības tests ļauj noteikt varbūtējas somatiskās mutācijas augļa šūnās.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Nav.

1.6. **Metodes apraksts**

Sagatavošanas darbi

Ja iespējams, pārbaudāmās vielas izšķīdina vai suspendē izotoniskā sāls šķīdumā. Ķīmiskas vielas, kas nešķīst ūdenī, izšķīdina vai suspendē piemērotā šķīdinātājā. Izmantotais šķīdinātājs nedrīkst ietekmēt pārbaudāmās vielas iedarbību vai būt toksisks. Izmanto tikko pagatavotus pārbaudāmās vielas šķīdumus vai suspensijas.

Izmēģinājumu dzīvnieki

T līnijas peles (*nonagouti*, a/a; *chinchilla*, *pink eye*, c^{ch} p/c^{ch} p; *brown*, b/b; *dilute*, *short ear*, d se/d se; *piebald spotting*, s/s) sapāro ar HT līnijas (*pallid*, *nonagouti*, *brachypody*, pa a bp/pa a bp; *leaden fuzzy*, ln fz/ln fz; *pearl* pe/pe) vai C57 BL līnijas (*nonagouti*, a/a) pelēm. Var sakrustot arī citas piemērotas līnijas, piemēram, NMRI (*nonagouti*, a/a; *albino*, c/c) ar DBA (*nonagouti*, a/a; *brown*, b/b; *dilute* d/d), ja šādi var iegūt *nonagouti* pēcnācējus.

Dzīvnieku skaits un dzimums

Jābūt tādam skaitam apstrādātu grūsnu mātīšu, kas ļauj pēc katras ievadītās devas iegūt dzīvus pēcnācējus pietiekamā daudzumā. Attiecīgā parauga lielums ir atkarīgs no plankumu skaita, ko novēro pelēm pēc aplikācijas, un no pieejamiem kontroles datiem. Negatīvs rezultāts apstiprināms tikai tad, ja ir pārbaudīti vismaz 300 pēcnācēji no mātītēm pēc lielākās devas iedarbības.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Vienlaikus jābūt kontroles datiem par pelēm, kas pakļautas tikai šķīdinātāja iedarbībai (negatīvā kontrole). Lai uzlabotu metodes precizitāti, var apkopot arī iepriekš tajā pašā laboratorijā iegūtus kontroles datus, ja tie nav pārāk izkliedēti. Ja pārbaudāmā viela neuzrāda mutagēnas īpašības, jāizmanto arī pozitīvās kontroles dati, kas nesen iegūti tajā pašā laboratorijā, ar šo pašu metodi pārbaudot kādu zināmu ķīmisko mutagēnu.

Ievadīšanas veids

Vielas ievadīšanai grūsnām mātītēm parasti izmanto perorālu intubāciju vai intraperitoniālu injekciju. Vajadzības gadījumā var izmantot inhalāciju vai citu aplikācijas veidu.

Izmantotās devas

Izmanto vismaz divas devas, no kurām vienai jābūt toksiskai vai tādai, kas samazina mazuļu skaitu metienā. Ja vielas nav toksiskas, tās jāizmanto pēc iespējas lielākā devā.

Testa norise

Parasti dzīvnieki saņem vienu devu 8., 9. vai 10. grūtniecības dienā, kā 1. dienu uzskatot dienu, kurā pirmoreiz novēro maksts embolu. Tas atbilst 7,25, 8,25 un 9,25 dienu termiņam pēc aizmešanās. Šajās dienās var ievadīt secīgas devas.

Analīze

Pēcnācējus šifrē un, sākot no 3. nedēļas līdz 4. nedēļai pēc atnešanās tiem reģistrē plankumus apmatojumā. Izšķir trīs dažādus plankumu veidus:

a) balti plankumi ne vairāk kā 5 mm attālumā no vēdera mediālās līnijas, kas, iespējams, radušies šūnu bojāejas rezultātā (*WMVS*);

b) dzelteni plankumi ap krūts dziedzeriem, dzimumorgāniem, uz kakla, padusēs un cirkšņos, kā arī pieres vidū, kas atgādina apmatojuma krāsu *agouti* un, iespējams, radušies traucētas diferenciācijas dēļ (*MDS*); un

c) izkaisīti krāsaini un balti apmatojuma plankumi, kas, iespējams, radušies somatisko mutāciju rezultātā (*RS*).

Reģistrē visus trīs plankumu veidus, bet tikai *RS* ir ģenētiski determinēti. Ja rodas grūtības atšķirt *MDS* no *RS*, tās var atrisināt, apskatot apmatojuma paraugus fluorescences mikroskopā.

Pēcnācējiem reģistrē izteiktas morfoloģiskas anomālijas.

2. IEGŪTIE DATI

Jānorāda kopējais analizēto pēcnācēju skaits un to dzīvnieku skaits, kam novērots viens vai vairāki plankumi, kuri, iespējams, radušies somatiskās mutācijas rezultātā. Ar piemērotām statistikas metodēm salīdzina datus par izmēģinājumu un kontroles dzīvniekiem. Datus atsevišķi apkopo arī par katru metienu.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— krustošanai izmantotās līnijas,

— grūsno mātīšu skaits izmēģinājumu un kontroles grupās,

— vidējais metiena lielums izmēģinājumu un kontroles grupās atnešanās un atšķiršanas brīdī,

— pārbaudāmās vielas deva(s),

— izmantotais šķīdinātājs,

— grūtniecības diena, kurā ievadīta pārbaudāmā viela,

— ievadīšanas veids,

— analizēto pēcnācēju kopējais skaits un to dzīvnieku skaits izmēģinājumu un kontroles grupās, kam novēroti *WMVS*, *MDS* un *RS*,

— izteiktas morfoloģiskas anomālijas,

— ja iespējams, *RS* biežums atkarībā no devas,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. **Izvērtējums un interpretācija**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

PĀRMANTOJAMO TRANSLOKĀCIJU NOTEIKŠANA PELĒM

1. METODE

1.1. Ievads

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.2. Definīcija

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

1.3. Standartvielas

Nav.

1.4. Metodes būtība

Veicot pārmantojamo translokāciju noteikšanu pelēm, pirmās paaudzes pēcnācējiem reģistrē strukturālas un skaitliskas hromosomu izmaiņas zīdītāju dzimumšūnās. Novērotās hromosomu izmaiņas ietver reciprokās translokācijas un, ja analizē arī sievišķos pēcnācējus, X hromosomas zudumu. Hromosomu translokāciju nesējiem un XO mātītēm ir pazemināta auglība, ko izmanto, lai atlasītu F_1 pēcnācējus citoģenētiskās analīzes veikšanai. Dažas translokācijas (starp X hromosomu un autosomu, kā arī starp centromēru un telomēru) izraisa pilnīgu sterilitāti. Translokāciju citoģenētiskajai analīzei izmanto vīrišķo īpatņu (F_1 tēviņu vai F_1 mātīšu vīrišķo pēcnācēju) šūnas mejozes ciklā, diakinēzes-metafāzes I laikā. XO mātītes var citoģenētiski atšķirt pēc tā, ka to kaula smadzeņu šūnās mitozes laikā parādās tikai 39 hromosomas.

1.5. Kvalitātes kritēriji

Nav.

1.6. Metodes apraksts

Sagatavošanas darbi

Pārbaudāmās vielas izšķīdina izotoniskā sāls šķīdumā. Ja vielas nešķīst ūdenī, tās izšķīdina vai suspendē piemērotā šķīdinātājā. Pārbaudāmās vielas šķīdumam jābūt tikko pagatavotam. Ja izmanto šķīdinātāju, kas atvieglo vajadzīgas devas ievadīšanu, tas nedrīkst reaģēt ar pārbaudāmo vielu vai būt toksisks.

Ievadīšanas veids

Parasti izmanto perorālu intubāciju vai intraperitoniālu injekciju. Var izmantot arī citus aplikācijas veidus.

Izmēģinājumu dzīvnieki

Šim nolūkam izmanto peles, jo to pavairošana un citoloģiskā izmeklēšana nerada īpašas grūtības. Var izmantot jebkuru peļu līniju. Tomēr ir svarīgi, lai vidēji katrā metienā būtu vairāk nekā 8 mazuļi un šim skaitam jābūt diezgan nemainīgam. Izmanto veselus un dzimumgatavību sasniegušus dzīvniekus.

Dzīvnieku skaits

Dzīvnieku skaits ir atkarīgs no spontāno translokāciju biežuma un no minimālā inducēto translokāciju skaita, kas vajadzīgs, lai iegūtu pozitīvu rezultātu.

Parasti analizē vīrišķos F_1 pēcnācējus. Katrā izmēģinājumu dzīvnieku grupā pārbauda vismaz 500 vīrišķo F_1 pēcnācēju. Ja pārbauda arī sievišķos F_1 pēcnācējus, ir jābūt 300 tēviņiem un 300 mātītēm.

Negatīvā un pozitīvā kontrole

Jābūt attiecīgiem kontroles datiem, kas iegūti tagad un iepriekšējos izmēģinājumos. Ja tajā pašā laboratorijā ir pieejami atbilstoši pozitīvās kontroles rezultāti, kas iegūti nesen veiktos eksperimentos, tos var izmantot tagadējās pozitīvās kontroles vietā.

Izmantotās devas

Pārbauda vienu vielas devu, parasti tā ir lielākā deva, kurai novēro minimālu toksisku iedarbību un kas neietekmē dzīvnieku reproduktīvo uzvedību vai izdzīvošanu. Lai noteiktu, kā vielas iedarbība mainās atkarībā no devas, papildus jābūt divām mazākām devām. Ja vielas nav toksiskas, tās jāizmanto pēc iespējas lielākā devā.

Testa norise

Vielas aplikācija un dzīvnieku pārošana

Pastāv divas aplikācijas shēmas. Pārbaudāmo vielu visbiežāk ievada vienreiz. Pārbaudāmo vielu var arī ievadīt 7 dienas nedēļā 35 dienu laikā. Pārošanās reižu skaits pēc aplikācijas ir atkarīgs no aplikācijas shēmas un tam jāaptver visas dzimumšūnu attīstības stadijas. Beidzoties pārošanās laikam, katru mātīti ievieto atsevišķā būrī. Pēc mātītes atnešanās reģistrē dienu, metiena lielumu un pēcnācēju dzimumu. Visus vīrišķos pēcnācējus atšķir no mātītes, bet sievišķos pēcnācējus tālāk neizmanto, ja nav paredzēts citādi.

Translokāciju heterozigotātes tests.

Var izvēlēties vienu no diviem iespējamiem paņēmieniem:

— F_1 pēcnācēju auglības tests un iespējamo translokāciju nesēju citoģenētiskā analīze,

— visu vīrišķo F_1 pēcnācēju citoģenētiskā analīze bez iepriekšējas atlases pēc auglības.

a) Auglības tests

Par to, ka F_1 īpatņa auglība ir pazemināta, var spriest pēc metiena lieluma un/vai dzemdes satura analīzes, ko veic mātītēm pēc pārošanās ar šo īpatni.

Izmantotajai peļu līnijai jānosaka normālas un pazeminātas auglības kritēriji.

Dati par metienu lielumu. F_1 tēviņus, katru atsevišķā būrī, sapāro ar tajā pašā eksperimentā iegūtām mātītēm vai ar mātītēm no tās pašas dzīvnieku populācijas. Dzīvniekus apskata katru dienu, sākot no 18. dienas pēc pārošanās. Atnešanās brīdī reģistrē metiena lielumu un F_2 pēcnācēju dzimumu, tie vairs netiek izmantoti. Jā pārbauda sievišķos F_1 pēcnācējus, F_2 pēcnācējus no maziem metieniem patur turpmākai analīzei. Sievišķos translokāciju nesējus identificē, veicot translokāciju citoģenētisko analīzi vismaz kādam no vīrišķajiem pēcnācējiem. XO mātītes var pazīt pēc tā, ka to pēcnācēju dzimumu (tēviņi: mātītes) skaitliskā attiecība mainās no 1:1 uz 1:2. Ja izmanto secīgo metodi, normālos F_1 dzīvniekus tālāk nepārbauda, ja pirmais F_2 metiens atbilst vai pārsniedz iepriekš noteikto normālo lielumu, pretējā gadījumā pārbauda otro vai trešo F_2 metienu.

F_1 dzīvniekus, kurus pēc pat triju F_2 metienu novērošanas nevar atzīt par normāliem, pārbauda, veicot dzemdes satura analīzi ar tiem sapārotajām mātītēm, vai tiešā veidā, veicot tiem citoģenētisko analīzi.

Dzemdes satura pārbaude. Metienu lieluma samazināšanās dzīvniekiem ar translokācijām ir izskaidrojama ar embriju bojāeju, tādējādi liels nedzīvu implantu skaits norāda uz to, ka pārbaudāmais dzīvnieks ir translokācijas nesējs. Katru analizējamo F_1 tēviņu sapāro ar divām vai trim mātītēm. Par aizmešanos liecina maksts embols, ja to konstatē, ik rītu apskatot dzīvniekus. Mātītes nokauj pēc 14-16 dienām un reģistrē dzemdē atrasto dzīvo un nedzīvo implantu skaitu.

b) Citoģenētiskā analīze

No sēkliniekiem izgatavo gaisā žāvētus preparātus. Translokāciju nesējus identificē pēc multivalentu konfigurācijām, ko novēro primārajos spermatocītos diakinēzes-metafāzes I laikā. Vismaz divas šūnas ar multivalentiem ir pietiekams pierādījums tam, ka analizējamais dzīvnieks ir translokācijas nesējs.

Ja dzīvnieku pavairošana noris bez atlases, citoģenētiski pārbauda visus F_1 tēviņus. Katram tēviņam mikroskopiski izvērtē vismaz 25 šūnas, kas iegūtas diakinēzes-metafāzes I laikā. F_1 tēviņiem, kam ir nelieli sēklinieki vai kam mejoze apstājusies pirms diakinēzes, kā arī F_1 mātītēm, ja ir aizdomas, ka tām ir XO genotips, pārbauda spermatogoniju vai kaula smadzeņu šūnas mitozes metafāzē. Ja ikvienā no 10 šūnām novēro neierasti garu un/vai īsu hromosomu, tas norāda uz to, ka ir notikusi īpaša translokācija, kas izraisa vīrišķo sterilitāti (c/t translokācijas tips). Dažas translokācijas starp X hromosomu un autosomu, kas izraisa vīrišķo sterilitāti, var konstatēt tikai pēc mitotisko hromosomu diferenciālās krāsošanas. Ja ikvienā no 10 mitozēm novēro tikai 39 hromosomas, tas liecina par to, ka mātītei ir XO genotips.

2. IEGŪTIE DATI

Datus apkopo tabulā.

Ziņojumā norāda metienu vidējo lielumu un dzimumu skaitlisko attiecību atnešanās un mazuļu atšķiršanas brīdī, ko novēro katrā pārošanās termiņā.

Pēc F_1 dzīvnieku auglības pārbaudes norāda metienu vidējo lielumu pēc katras normālas pārošanās un katra atsevišķa metiena lielumu F_1 translokāciju nesējiem. Pēc dzemdes satura pārbaudes norāda dzīvo un nedzīvo implantu vidējo skaitu normāliem dzīvnieku pāriem un dzīvo un nedzīvo implantu skaitu pēc katras F_1 translokāciju nesēju pārošanās.

Pēc diakinēzes-metafāzes I citoģenētiskās analīzes katram translokāciju nesējam norāda multivalentu konfigurāciju tipu skaitu un kopējo šūnu skaitu.

Steriliem F_1 īpatņiem norāda kopējo pārošanās skaitu un pārošanās perioda ilgumu. Norāda arī sēklinieku svaru un pievieno citoģenētiskās analīzes aprakstu.

Ziņojumā iekļauj metienu vidējo lielumu XO mātītēm, F_2 pēcnācēju dzimumu skaitlisko attiecību un citoģenētiskās analīzes rezultātus.

Ja iepriekš veic varbūtējo F_1 translokāciju nesēju atlasi, izmantojot auglības pārbaudi, tabulās jāiekļauj ziņas par to, cik dzīvniekiem ir novērota translokācijas heterozigotāte.

Ziņojumā arī jāietver negatīvās un pozitīvās kontroles dati.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, jānorāda šādas ziņas:

— izmantotā peļu līnija, dzīvnieku vecums, apstrādāto dzīvnieku svars,

— katra dzimuma vecākdzīvnieku skaits izmēģinājumu un kontroles grupās,

— testa apstākļi, aplikācijas shēma, izmantotās devas, šķīdinātāji, pārošanās shēma,

— katras mātītes pēcnācēju skaits un dzimums, to pēcnācēju skaits un dzimums, kam veikta translokāciju analīze,

— translokāciju analīzes termiņi un kritēriji,

— translokāciju nesēju skaits un padziļināts raksturojums, vajadzības gadījumā norādot datus par pārošanu un dzemdes satura pārbaudi,

— citoģenētikas metodes un sīks mikroskopiskās analīzes apraksts, vēlams, pievienojot attēlus,

— statistiskais novērtējums,

— rezultātu iztirzājums,

— rezultātu interpretācija.

3.2. Izvērtējums un interpretācija

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

Skat. vispārīgā ievada B daļu.

C DAĻA: EKOTOKSICITĀTES NOTEIKŠANAS METODES

VISPĀRĪGS IEVADS: C DAĻA

Šeit aprakstītās testa metodes paredzētas dažu Direktīvas 79/831/EEK VIII pielikumā minēto ekotoksikoloģisko īpašību noteikšanai. Iesniedzējiem jāņem vērā, ka šajā dokumentā nav ietvertas šādu VIII pielikuma 1. līmenī paredzēto īpašību noteikšanas metodes:

— ilgstoši toksicitātes pētījumi ar *Daphnia magna*,

— ietekme uz augstākajiem augiem,

— ilgstoši toksicitātes pētījumi ar zivīm,

— spēja akumulēties sugas pārstāvjos kopumā.

Pēc minēto īpašību noteikšanai atbilstošu testa metožu galīgās izstrādes tās publicēs kā tālākus pielāgojumus tehnikas attīstībai. Līdz tam iesniedzējiem jāizmanto atbilstošas starptautiski atzītas metodes, kuras identificē kompetentajai iestādei.

AĻĢU AUGŠANAS KAVĒŠANAS TESTS

1. METODE

1.1. Ievads

Šā testa mērķis ir noteikt, kā viela ietekmē vienšūnas zaļaļģu augšanu. Relatīvi neilgos testos iespējams novērtēt vielas ietekmi vairākās paaudzēs. Šo metodi var pielāgot vairākām vienšūnas zaļaļģu sugām, un šādā gadījumā testa ziņojumam jāpievieno izmantotās metodes apraksts.

Visvienkāršāk šo metodi ir piemērot ūdenī šķīstošām vielām, kas testa apstākļos, visticamāk, paliks ūdenī.

Attiecībā uz vielām, kuru šķīdība testa vidē ir ierobežota, var nebūt iespējams kvantitatīvi noteikt EK_{50} (sk. "Definīcijas" še turpmāk).

Šo metodi var izmantot attiecībā uz vielām, kuru kavējošā ietekme uz aļģu augšanu nav tieša.

Šā testa veikšanā var noderēt šāda informācija:

— pārbaudāmās vielas šķīdība ūdenī,

— tvaika spiediens,

— struktūrformula,

— vielas tīrība,

— ķīmiskā stabilitāte ūdenī un gaismā,

— analīzes metodes konkrētās vielas kvantitatīvai noteikšanai ūdenī,

— pK_a vērtība,

— n-oktanola/ūdens sadalījuma koeficients,

— bioloģiskās noārdīšanās spējas testa rezultāti.

1.2. Definīcijas un vienības

Šūnu koncentrācija: šūnu skaits vienā mililitrā.

Pieaugums: šūnu koncentrācijas pieaugums testa laikā.

Augšanas ātrums: šūnu koncentrācijas palielinājums laika vienībā.

EK_{50}: šajā metodē – pārbaudāmās vielas koncentrācija, kas izraisa pieauguma vai augšanas ātruma samazinājumu 50 % apmērā attiecībā pret kontrolkultūru.

NOEC (koncentrācija bez efekta novērojuma): šajā metodē – augstākā pārbaudītā koncentrācija, kādā izmērītie rādītāji neliecina par vērā ņemamu augšanas kavēšanu attiecībā pret kontrolvērtībām.

1.3. Standartvielas

Neapmierinošu testa apstākļu atklāšanas nolūkā var testēt standartvielu. Ja izmanto standartvielu, tad testa ziņojumā jānorāda attiecīgie rezultāti. Par standartvielu var izmantot kālija dihromātu.

1.4. Testa metodes būtība

Uz eksponenciāli augošām atlasītu zaļaļģu kultūrām vairākās paaudzēs un noteiktos apstākļos ļauj iedarboties pārbaudāmai vielai dažādās koncentrācijās. Nosaka augšanas kavēšanu noteiktā laikposmā attiecībā pret kontrolkultūru.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

1.5.1. *Testa rezultātu derīguma nosacījumi*

Šūnu koncentrācijai kontrolkultūrās triju dienu laikā jāpieaug vismaz sešpadsmitkārt.

Pārbaudāmās vielas pāriešana no ūdens biomasā ne vienmēr nozīmē to, ka testa rezultāti ir nederīgi.

1.6. **Testa metodes apraksts**

1.6.1. *Sagatavošanās testam*

1.6.1.1. Iekārtas un materiāli

— Parastais laboratorijas aprīkojums.

— Testa kolbas ar atbilstīgu tilpumu (piem., koniskās kolbas ar 250 ml tilpumu ir piemērotas tad, ja testa šķīduma tilpums ir 100 ml).

— Kultūras audzēšanas iekārta: kabīne vai kamera, kurā temperatūru iespējams uzturēt 21 līdz 25 ± 2 °C robežās un kurā nodrošināts pastāvīgs, vienmērīgs apgaismojums ar gaismas spektra diapazonu no 400 līdz 700 nm. (Ieteicamā kvantu plūsma ir 0,72 × 10^{20} fotoni/m^2s ± 20 %. Šī kvantu plūsma atbilst 120 µE/m^2s, un to var iegūt ar universālajām baltās dienasgaismas spuldzēm (gaismas-temperatūras rādītājs aptuveni 4 200 K), kur apgaismojums, mērot ar sfērisko kolektoru, ir aptuveni 8 000 luksi.

— Iekārta, kas paredzēta šūnu koncentrāciju noteikšanai, piem., elektronisks daļiņu skaitītājs, mikroskops ar skaitīšanas kameru, fluorometrs, spektrofotometrs, kolorimetrs (*Piezīme*: lai iegūtu derīgus mērījumus, mērot ar spektrofotometru zemās šūnu koncentrācijās, var būt nepieciešams izmantot kivetes, kuru optiskais ceļš ir vismaz 4 cm).

1.6.1.2. Aļģu barotne

Ieteicama šāda barotne:

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

Šīs barotnes pH pēc stabilizēšanās gaisā ir aptuveni 8.

Minētais ieteikums neizslēdz iespēju izmantot citas barotnes, ja vien ir ievēroti šādi pamatsastāvdaļu limiti:

P:	≤ 0,7 mg/1,
N:	≤ 10 mg/1,
helātu veidošanās aģenti:	≤ 10^{-3} mmol/1,
cietība (Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol/1.

Ieteicamā barotne un barotne, kas minēta atsaucē [1], atbilst šai prasībai.

1.6.1.3. Testa organismi

Sugu izvēle

Ieteicams izmantot kultūras audzēšanai un testēšanai ērtās ātraudzīgās zaļaļģu sugas. Par piemērotām uzskatāmas šādas sugas:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Ja izmanto citas sugas, jānorāda attiecīgais celms.

1.6.1.4. Testa plānošana

Sākotnējā šūnu koncentrācija

Ieteicams, lai sākotnējā šūnu koncentrācija *Selenastrum capricornutum* un *Scenedesmus subspicatus* testa kultūrās ir aptuveni 10^4 šūnas/ml. Ja izmanto citas sugas, tad to biomasai jābūt pielīdzināmai šai vērtībai.

Pārbaudāmās vielas koncentrācijas

Koncentrācijas diapazonu, kurā varētu izpausties pārbaudāmās vielas ietekme, nosaka, pamatojoties uz iedarbības diapazona noteikšanas rezultātiem. Minētā testa veikšanai jāizvēlas vismaz piecas ģeometrisku sēriju veidojošas koncentrācijas. Zemākajai testā lietotajai koncentrācijai nav jārada novērojama ietekme uz aļģu augšanu. Augstākajai testā lietotajai koncentrācijai jākavē augšana par vismaz 50 % attiecībā pret kontrolkultūru un, vēlams, pilnībā jāaptur augšana.

Atkārtojumi un kontrolkultūras

Plānojot testu, vēlams paredzēt trīs atkārtojumus katrai testa koncentrācijai un, ideālā gadījumā, divtik daudz kontrolkultūru. Ja tam ir pamatojums, testa plānojumu var mainīt, palielinot pārbaudāmo koncentrāciju skaitu un samazinot to atkārtojumu skaitu, ko veic attiecībā uz vienu koncentrāciju.

Ja pārbaudāmās vielas šķīdināšanai izmanto šķīdinātāju, tad testa plānojumā jāparedz papildu kontrolkultūras, kuru sastāvā šis šķīdinātājs ir visaugstākajā koncentrācijā, kāda izmantota testa kultūrās.

1.6.2. *Testa veikšana*

Šajā punktā ietverti ieteikumi ūdenī viegli šķīstošu vielu, ūdenī vāji šķīstošu vielu un gaistošu vielu testēšanai.

1.6.2.1. Ūdenī viegli šķīstošu vielu testēšana

Testa kultūras, kas sastāv no pārbaudāmās vielas vēlamajās koncentrācijās un vēlamā daudzuma aļģu inokulāta, sagatavo, atšķaidot tās ar filtrētu aļģu barotni, pārbaudāmās vielas standartšķīdumu alikvotajām daļām un aļģu suspensijas alikvoto daļu.

Kolbas ar kultūrām sakrata un ievieto kultūras audzēšanas iekārtā. Testa laikā aļģēm jāatrodas suspendētā stāvoklī, un jānotiek CO_2 pārneses veicināšanai. Šai nolūkā kultūras var kratīt, maisīt vai aerēt. Kultūrām pastāvīgi jāatrodas 21 - 25 °C temperatūrā, kas var svārstīties ± 2 °C robežās.

Šūnu koncentrāciju katrā kolbā nosaka vismaz 24, 48 un 72 stundas pēc testa sākuma. Filtrēto aļģu barotni izmanto, lai noteiktu fona līmeni, ja izmanto daļiņu skaitītājus, vai kā tukšo analīzi, ja izmanto spektrofotometrus.

pH izmēra testa sākumā un 72 stundas pēc sākuma.

Parasti testa laikā šķīdumu pH vērtībām nebūtu jānovirzās par vairāk nekā vienu vienību.

1.6.2.2. Ūdenī vāji šķīstošu vielu testēšana

Ja pārbaudāmās vielas šķīdība ir salīdzināma ar augstāko testā izmantoto koncentrāciju, tad, gatavojot testa šķīdumus, vajag tikai nedaudz atkāpties no iepriekš aprakstītās metodes. Par pārbaudāmās vielas standartšķīdumu var izmantot piesātinātu šķīdumu. Cita iespēja ir pirms pievienošanas aļģu suspensijai pārbaudāmo vielu vēlamajā koncentrācijā izšķīdināt aļģu barotnē.

Ūdenī vāji šķīstošu vielu standartšķīdumus var gatavot, tās mehāniski disperģējot vai izmantojot saistvielas, kuru toksicitāte attiecībā pret aļģēm ir neliela, piemēram, organiskos šķīdinātājus, emulgatorus vai disperģētājvielas. Ja izmanto šķīdinātāju, tā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 100 mg/l, un testa plānojumā jāparedz papildu kontrolkultūras, kuru sastāvā šī saistviela ir visaugstākajā koncentrācijā, kāda atrodama testa šķīdumos.

1.6.2.3. Gaistošu vielu testēšana

Šobrīd nav vispārpieņemta veida, kā testēt gaistošas vielas. Ja zināms, ka vielai ir tendence iztvaikot, tad var izmantot slēgtas testa kolbas ar palielinātu augšējās daļas tilpumu. Šai metodei ir dažādas variācijas [1].

Jācenšas noteikt attiecīgās vielas daudzumu, kas paliek šķīdumā, un testu rezultātus, kas iegūti ar gaistošām ķīmiskām vielām slēgtās sistēmās, ieteicams interpretēt sevišķi piesardzīgi.

2. DATI UN TO NOVĒRTĒŠANA

Testa kultūrās un kontrolkultūrās izmērītās šūnu koncentrācijas apkopo tabulā kopā ar pārbaudāmās vielas koncentrācijām un mērījumu laikiem. Šūnu koncentrācijas vidējo vērtību visās pārbaudāmās vielas koncentrācijās un kontrolkultūrā ataino grafiski atkarībā no laika, tā iegūstot pieauguma līknes.

Koncentrācijas/ietekmes sakarības noteikšanai izmanto šādas divas metodes.

2.1. **Pieauguma līkņu norobežoto laukumu salīdzināšana**

Pieauguma līkņu norobežoto laukumu var aprēķināt pēc šādas formulas:

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

kur

A = laukums,

N_0 = nominālais šūnu skaits 1 ml laikā t_0,

N_1 = izmērītais šūnu skaits 1 ml laikā t_1,

N_n = izmērītais šūnu skaits 1 ml laikā t_n,

t_1 = testa pirmā mērījuma veikšanas laiks,

t_n = testa n-tā mērījuma veikšanas laiks.

Šūnu augšanas kavēšanas procentuālo apmēru attiecīgajā pārbaudāmās vielas koncentrācijā (I_A) aprēķina kā kontrolkultūras pieauguma līknes norobežotā laukuma (A_c) un pārbaudāmās vielas koncentrācijai atbilstošās pieauguma līknes norobežotā laukuma (A_t) starpību:

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

I_A vērtības atliek puslogaritmiskajā diagrammā vai puslogaritmiskajā varbūtības vienību diagrammā iepretim atbilstošajām koncentrācijām. Atliekot punktus varbūtības vienību diagrammā, tos pēc acumēra izvieto uz taisnas līnijas vai arī, ja pieņem logaritmiski normālas distribūcijas varbūtību, var veidot datorizētu regresijas līniju.

EK_{50} vērtību nolasa punktā, kur krustojas (regresijas) līnija un abscisai paralēla līnija, kurai I_A vērtība ir 50 %. Lai nepārprotami norādītu, ka minētā vērtība aprēķināta pēc šīs metodes, ieteicams izmantot simbolu E_bC_{50}. Pēc šīs metodes aprēķinātās vērtības saistībā ar mērījumiem, kas veikti 24, 48 un 72 stundas pēc testa sākuma, apzīmē ar simbolu E_bC_{50} (0—72 h).

Citas EK vērtības, piemēram E_bC_{10}, tāpat var nolasīt I_A vērtībai atbilstošās taisnes un koncentrācijas logaritma līknes krustpunktā.

2.2. **Pieauguma ātrumu salīdzināšana**

Konkrētā pieauguma ātruma vidējo vērtību (μ) eksponenciāli augošām kultūrām var aprēķināt šādi:

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

Cita iespēja ir konkrētā pieauguma ātruma vidējo vērtību nolasīt pēc regresijas līnijas slīpuma diagrammā, kas ataino ln N vērtības un laika attiecību.

Konkrētā pieauguma ātruma vidējās vērtības procentuālā samazinājuma apmēru pie pārbaudāmās vielas attiecīgās koncentrācijas salīdzinājumā ar kontrolvērtību atliek diagrammā iepretim attiecīgajam koncentrācijas logaritmam. Atbilstošo EK_{50} vērtību var nolasīt no iegūtās diagrammas. Lai nepārprotami norādītu, ka minētā EK_{50} vērtība iegūta ar šo metodi, ieteicams izmantot simbolu E_rC_{50}. Jānorāda arī mērījuma veikšanas laiks, piem., ja vērtība attiecas uz novērojuma laikiem 24 un 48 stundas pēc testa sākuma, lieto simbolu E_rC_{50} (24 – 48 h).

Piezīme: konkrētais pieauguma ātrums ir logaritmisks termins, un nelielas pieauguma ātruma izmaiņas var izraisīt lielas biomasas izmaiņas. Tādēļ E_bC un E_rC vērtības ir skaitliski nesalīdzināmas.

3. **ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA**

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— pārbaudāmā viela: ķīmiskās identifikācijas dati,

— testa organismi: izcelsme, laboratorijas kultūra, celma numurs, audzēšanas metode,

— testa apstākļi:

  — testa sākuma un beigu datums un testa ilgums,

  — temperatūra,

  — barotnes sastāvs,

— kultūras audzēšanas iekārta,

— šķīdumu pH testa sākumā un beigās (ja novērotas pH vērtības novirzes par vairāk nekā vienu vienību, tad tās jāizskaidro),

— šķīdinātājs un metode, kas izmantota pārbaudāmās vielas šķīdināšanai, un šķīdinātāja koncentrācija testa šķīdumos,

— gaismas intensitāte un kvalitāte,

— testētās koncentrācijas (izmērītās vai nominālās).

— Rezultāti:

— šūnu koncentrācija visās kolbās visos mērījuma punktos un šūnu koncentrācijas mērīšanas metode,

— šūnu koncentrācijas vidējās vērtības,

— augšanas līknes,

— koncentrācijas un tās ietekmes savstarpējās atkarības grafisks attēlojums,

— EK (efektīvās koncentrācijas) vērtības un to aprēķina metode,

— NOEC,

— citas novērotās ietekmes.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

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.

Papildinājums

AĻĢU KULTIVĒŠANAS METODES PIEMĒRS

Vispārīgas piezīmes

Šo metodi izmanto, lai iegūtu aļģu kultūras toksicitātes testiem.

Ar atbilstošām metodēm jānodrošina, lai aļģu kultūras nebūtu inficētas ar baktērijām (ISO 4833). Var būt vēlams izmantot aksēniskas kultūras, bet būtiski svarīgi ir lietot vienas sugas aļģu kultūras.

Lai novērstu inficēšanos ar baktērijām un citām aļģēm, darbības var veikt sterilos apstākļos.

Iekārtas un materiāli

Skatīt 1.6.1. punktu: sagatavošanās testam un testa organismi.

Aļģu kultūru ieguves metodes

Barības elementu šķīduma (barotnes) sagatavošana

Visus barotnes barības elementu sāļus sagatavo koncentrētu standartšķīdumu veidā un uzglabā tumšā un vēsā vietā. Šos šķīdumus sterilizē, filtrējot vai karsējot autoklāvā.

Barotni sagatavo, atbilstošos standartšķīdumu daudzumus pievienojot sterilam destilētam ūdenim un raugoties, lai nenotiktu inficēšanās. Cietās barotnēs pievieno 0,8 % agara.

Izejas kultūra

Izejas kultūras ir nelielas aļģu kultūras, kuras regulāri pārvieto svaigā barotnē un kuras izmanto par sākotnējo pārbaudāmo materiālu. Ja šīs kultūras neizmanto regulāri, tās svītrās uzsēj uz mēģenēs slīpi novietota agara. Vismaz reizi divos mēnešos tās pārvieto svaigā barotnē.

Izejas kultūras audzē koniskās kolbās ar atbilstošu barotni (tilpums aptuveni 100 ml). Ja aļģes inkubē 20 °C temperatūrā un pastāvīgā apgaismojumā, tās jāpārvieto katru nedēļu.

Pārvietošanas laikā daļu "vecās" kultūras ar sterilu pipeti pārnes kolbā ar svaigu barotni tā, lai ātraudzīgo sugu sākotnējā koncentrācija būtu apmēram 100 reizes mazāka nekā vecajā kultūrā.

Sugas pieauguma ātrumu var noteikt pēc pieauguma līknes. Ja tas ir zināms, tad ir iespējams noteikt blīvumu, kuru sasniedzot, kultūra būtu jāpārvieto jaunā barotnē. Tas jāveic pirms kultūras bojāejas stadijas iestāšanās.

Starpkultūra

Starpkultūra vajadzīga, lai iegūtu aļģu materiālu, kas ir derīgs inokulēšanai testa kultūrās. Starpkultūru inkubē attiecīgā testa apstākļos un izmanto, kamēr tā vēl aug eksponenciāli – visbiežāk pēc aptuveni trīs dienu ilga inkubācijas perioda. Ja šūnas aļģu kultūrā ir deformētas vai anormālas, tad tā nav derīga izmantošanai.

TOKSICITĀTES NOTEIKŠANA SLIEKĀM

MĀKSLĪGĀS AUGSNES TESTS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Šajā laboratoriskajā pārbaudē pārbaudāmo vielu pievieno mākslīgai augsnei, kurā uz 14 dienām ievieto sliekas. Pēc šā laika posma (un vajadzības gadījumā pēc septiņām dienām) pēta attiecīgās vielas nāvējošo ietekmi uz sliekām. Ar šā testa metodi var relatīvi īsā laikā izpētīt ķimikāliju ietekmi uz sliekām saistībā ar šo vielu uzņemšanu caur ādu un ar barību.

1.2. **Definīcija un vienības**

LC_{50} (vidējā letālā koncentrācija): vielas koncentrācija, kas testa laikā nogalina 50 % testa dzīvnieku.

1.3. **Standartviela**

Standartvielu izmanto regulāri, lai parādītu, ka testa sistēmas jutība nav būtiski mainījusies.

Ieteicamā standartviela ir analītiski tīrs hloracetamīds.

1.4. **Testa princips**

Augsne ir mainīga vide, tādēļ šajā testā izmanto smilšmālu, kura sastāvs ir rūpīgi definēts. Pieaugušas *Eisenia foetida* sugas sliekas (sk. piezīmi papildinājumā) tur noteiktā mākslīgajā augsnē, kuru apstrādā ar pārbaudāmo vielu dažādās koncentrācijās. Konteineru saturu 14 dienas (un vajadzības gadījumā septiņas dienas) pēc testa sākuma izklāj uz paplātes un saskaita izdzīvojušās sliekas pie katras koncentrācijas.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Tests izstrādāts tā, lai tas būtu pēc iespējas precīzāk reproducējams testa substrāta un testa organismu ziņā. Mirstība kontrolsubstrātā testa beigās nedrīkst pārsniegt 10 %, citādi testa rezultāti ir nederīgi.

1.6. **Testa metodes apraksts**

1.6.1. *Materiāli*

1.6.1.1. Testa substrāts

Testa pamatsubstrāts ir mākslīgā augsne ar noteiktu sastāvu.

a) Pamatsubstrāts (norādīts sausnas procentuālais sastāvs):

— 10 % sfagnu kūdras (pēc iespējas tuvāk pH vērtībai robežās no 5,5 līdz 6,0, bez redzamām augu atliekām, smalka maluma),

— 20 % kaolinīta māla, kura sastāvā, vēlams, ir vairāk nekā 50 % kaolinīta,

— apmēram 69 % rūpniecisko kvarca smilšu (pārsvarā smalkā smilts, kurā vairāk nekā 50 % daļiņu ir izmērā no 0,05 līdz 0,2 mm). Ja vielas dispersija ūdenī ir nepietiekoša, uz katru testa konteineru vajadzētu būt pieejamiem 10 g vielas, kas paredzēti vēlākai iejaukšanai pārbaudāmā vielā,

— apmēram 1 % kalcija karbonāta ($CaCO_3$), kas ir pulverizēts, ķīmiski tīrs un pievienots, lai pH vērtība būtu 6,0 ± 0,5.

b) Testa substrāts

Testa substrāta sastāvā ir pamatsubstrāts, pārbaudāmā viela un dejonizēts ūdens.

Ūdens saturs ir apmēram 25 līdz 42 % no pamatsubstrāta sausnas. Substrāta ūdens saturu nosaka, izžāvējot paraugu līdz nemainīgam svaram 105 °C temperatūrā. Galvenais kritērijs mākslīgās augsnes samitrināšanā ir tāds, ka samitrinātajā augsnē nav stāvoša ūdens. Maisot jānodrošina pārbaudāmās vielas vienmērīga izplatība substrātā. Jānorāda, kāds paņēmiens izmantots, lai pārbaudāmo vielu iemaisītu substrātā.

c) Kontrolsubstrāts

Kontrolsubstrāts sastāv no pamatsubstrāta un ūdens. Ja izmanto kādu piedevu, tad jābūt papildu kontrolsubstrātam, kura sastāvā ir tāds pats daudzums minētās piedevas.

1.6.1.2. Testa konteineri

Stikla konteineri ar tilpību aptuveni viens litrs (pienācīgi nosegti ar plastmasas vākiem, šķīvjiem vai plastmasas plēvi, kurā ir caurumi ventilācijai), piepildīti ar tādu mitra testa substrāta vai kontrolsubstrāta daudzumu, kas ir līdzvērtīgs 500 g substrāta sausnas.

1.6.2. *Testa apstākļi*

Konteineri jātur klimata kontroles kamerā 20 ± 2 °C temperatūrā un pastāvīgā apgaismojumā. Gaismas intensitātei jābūt no 400 līdz 800 luksiem.

Testa ilgums ir 14 dienas, bet vajadzības gadījumā mirstību var novērtēt arī septiņas dienas pēc testa sākuma.

1.6.3. *Testa metode*

Testa koncentrācijas

Pārbaudāmās vielas koncentrāciju izsaka ar vielas svaru uz pamatsubstrāta sausnas vienību (mg/kg).

Iedarbības diapazona noteikšana

To koncentrāciju diapazonu, kas izraisa mirstību 0 līdz 100 % apmērā, var noskaidrot ar iedarbības diapazona noteikšanas testu, šādi iegūstot informāciju par galīgajā testā izmantojamo koncentrāciju diapazonu.

Viela jātestē šādās koncentrācijās: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg vielas uz kilogramu testa substrāta (sausna).

Ja paredzēts veikt pilnīgu galīgo testu, tad iedarbības diapazona noteikšanas testā pietiek ar vienu testa partiju katrai koncentrācijai un vienu neapstrādātu kontrolpartiju, kur katrā partijā ir 10 sliekas.

Galīgais tests

Iedarbības diapazona noteikšanas testa rezultātus izmanto, lai atlasītu vismaz piecas ģeometrisku sēriju veidojošas koncentrācijas, kas izraisa mirstību 0 līdz 100 % apmērā un viena no otras atšķiras ar nemainīga lieluma faktoru, kurš nepārsniedz 1,8.

Ar testiem, kuros izmanto šādas koncentrāciju sērijas, vajadzētu spēt noteikt LC_{50} vērtību un tās ticamības robežas tik precīzi, cik vien tas iespējams.

Galīgajā testā izmanto vismaz četras testa partijas katrai koncentrācijai un četras neapstrādātas kontrolpartijas, kur katrā ir 10 sliekas. No šīm partijām iegūtos rezultātus uzrāda kā vidējo vērtību un standartnovirzi.

Ja divas secīgas koncentrācijas, kuru attiecība ir 1,8, izraisa tikai 0 % un 100 % mirstību, tad pietiek ar šīm divām vērtībām, lai noteiktu diapazonu, kam atbilst LC_{50} vērtība.

Testa pamatsubstrāta un pārbaudāmās vielas maisījums

Testa substrātu, ja iespējams, sagatavo, neizmantojot papildu aktīvās vielas, bet tikai ūdeni. Tieši pirms testa sākuma pārbaudāmās vielas emulsiju vai dispersiju dejonizētā ūdenī vai citā šķīdinātājā iemaisa testa pamatsubstrātā vai vienmērīgi izsmidzina uz tā virsmas, izmantojot smalku hromatogrāfisku vai tamlīdzīgu smidzinātāju.

Ja pārbaudāmā viela nešķīst ūdenī, to var izšķīdināt pēc iespējas mazākā tilpumā piemērota organiska šķīdinātāja (piem., heksāna, acetona vai hloroforma).

Pārbaudāmās vielas šķīdināšanai, disperģēšanai vai emulģēšanai drīkst izmantot tikai tādas aktīvās vielas, kas tūlīt izgaist. Testa substrātu pirms izmantošanas jāventilē. Iztvaikojušā ūdens daudzumu jāaizstāj. Ja izmanto papildu aktīvās vielas, tad kontrolpartijā tām jābūt tikpat lielā daudzumā.

Ja pārbaudāmā viela nav izšķīdināma, disperģējama vai emulģējama organiskos šķīdinātajos, tad 10 g maisījuma, kas sastāv no smalkas kvarca smilts un tāda pārbaudāmās vielas daudzuma, kas vajadzīgs, lai apstrādātu 500 g mākslīgās augsnes sausnas, samaisa ar 490 g testa substrāta sausnas.

Testa partiju veido, ievietojot stikla konteinerā tādu daudzumu mitra testa substrāta, kas atbilst 500 g sausnas, un uz šā testa substrāta virsmas uzliekot 10 sliekas, kuras 24 stundas ir kondicionētas līdzvērtīgā mitrā pamatsubstrātā un pēc tam ātri nomazgātas, pirms slieku izmantošanas lieko ūdeni nosusinot ar filtrpapīru.

Konteinerus pārsedz ar perforētiem plastmasas vākiem, šķīvjiem vai plēvi, lai novērstu substrāta izžūšanu, un tos 14 dienas tur testa apstākļos.

Novērtējums jāveic 14 dienas (un vajadzības gadījumā septiņas dienas) pēc testa sākuma. Substrātu izlīdzina uz stikla vai nerūsējošā tērauda plāksnes. Apskata sliekas un nosaka izdzīvojušo slieku skaitu. Slieku uzskata par nedzīvu, ja tā nereaģē uz vieglu mehānisku kairinājumu priekšgalā.

Ja mirstību pārbauda pēc septiņām dienām, tad pēc pārbaudes konteineru atkal piepilda ar to pašu testa substrātu un izdzīvojušās sliekas novieto uz šā substrāta virsmas.

1.6.4. *Testa organismi*

Testa organismi ir pieauguši *Eisenia foetida* īpatņi (sk. piezīmi papildinājumā) (vismaz divus mēnešus veci, ar jostiņu), kuru svars ir no 300 līdz 600 mg. (Pavairošanas metodi sk. papildinājumā.)

2. DATI

2.1. Rezultātu apstrāde un novērtēšana

Testētās vielas koncentrācijas norāda kopā ar atsauci uz atbilstošajiem bojājājušo slieku procentuālajiem daudzumiem.

Ja dati ir adekvāti, tad LC_{50} vērtību un ticamības robežas (p = 0,05) nosaka ar standartmetodēm (Ličfīlds un Vilkoksons, 1949, vai līdzvērtīga metode). LC_{50} vērtību izsaka miligramos pārbaudāmās vielas uz kilogramu testa substrāta (sausna).

Ja koncentrācijas līknes slīpums ir pārāk stāvs, lai varētu aprēķināt LC_{50} vērtību, pietiek ar šīs vērtības grafisku novērtējumu.

Ja divas secīgas koncentrācijas, kuru attiecība ir 1,8, izraisa tikai 0 % un 100 % mirstību, tad pietiek ar šīm divām vērtībām, lai noteiktu diapazonu, kam atbilst LC_{50} vērtība.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— apgalvojums, ka tests ir veikts saskaņā ar iepriekšminētajiem kvalitātes kritērijiem,

— testa veids (iedarbības diapazona noteikšanas tests un/vai galīgais tests),

— precīzs testa apstākļu apraksts vai apgalvojums, ka tests ir veikts saskaņā ar attiecīgo metodi,

— jānorāda visas atkāpes, precīzs tā paņēmiena apraksts, kas izmantots, lai pārbaudāmo vielu iemaisītu testa pamatsubstrātā,

— informācija par testa organismiem (suga, vecums, vidējais svars un svara diapazons, turēšanas un pavairošanas apstākļi, piegādātājs),

— LC_{50} noteikšanas metode,

— testa rezultāti, kā arī visi izmantotie dati,

— novēroto simptomu vai testa organismu uzvedības izmaiņu apraksts,

— mirstība kontrolsubstrātā,

— LC_{50} vai augstākā testētā koncentrācija bez mirstības un zemākā testētā koncentrācija ar 100 % mirstību 14 dienas (un, ja vajadzīgs, septiņas dienas) pēc testa sākuma,

— koncentrācijas/ietekmes līkne,

— ar standartvielu iegūtie rezultāti, kas var būt saistīti ar konkrēto testu vai ar agrākiem kvalitātes kontroles pasākumiem.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 207, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Edwards, C. A. and Lofty, J.R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331. lpp.

3. Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecologie et Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671. lpp.

4. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, 99. lpp.

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 Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Papildinājums

Slieku pavairošana un turēšana pirms testēšanas

Slieku pavairošanas nolūkā 30 līdz 50 pieaugušas sliekas ievieto pavairošanas kastē ar svaigu substrātu un pēc 14 dienām izņem no tās. Šos dzīvniekus var izmantot tālākai pavairošanai. No kokoniem izšķīlušās sliekas testēšanai izmanto, kad tās ir sasniegušas briedumu (saskaņā ar paredzētajiem apstākļiem – pēc diviem vai trim mēnešiem).

Turēšanas un pavairošanas apstākļi

Klimata kontroles kamera:	temperatūra 20 ± 2 °C, vēlams pastāvīgs apgaismojums (intensitāte no 400 līdz 800 luksiem).
Pavairošanas kastes:	piemēroti, sekli konteineri, kuru tilpums ir no 10 līdz 20 l.
Substrāts:	*Eisenia foetida* var pavairot dažādu dzīvnieku ekskrementos. Ieteicams par pavairošanas substrātu izmantot maisījumu, kurā 50 % tilpuma ir kūdra un 50 % - liellopu vai zirgu mēsli. pH vērtībai šajā substrātā jābūt apmēram 6 līdz 7 (to regulē ar kalcija karbonātu), un substrātam jābūt ar zemu jonu vadītspēju (mazāk nekā 6 mmhos vai 0,5 % sāls koncentrācijas).
	Substrātam jābūt mitram, bet ne pārāk slapjam.
	Bez iepriekš aprakstītās metodes var izmantot arī citus sekmīgi lietotus paņēmienus.

Piezīme: Ir divas *Eisenia foetida* pasugas, kuras daži taksonomisti nodala kā atsevišķas sugas (Bušs, 1972). Morfoloģiski tās ir līdzīgas, bet vienai, *Eisenia foetida foetida*, raksturīgs šķērsenisks segmentu iesvītrojums, kamēr otrai, *Eisenia foetida andrei*, tāda nav, toties novērojams daudzveidīgs iesarkans krāsojums. Ja iespējams, jāizmanto *Eisenia foetida andrei*. Citas sugas var izmantot tad, ja ir pieejama vajadzīgā metodoloģija.

BIODEGRADĀCIJA

CĀNA-VELLENA TESTS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Šīs metodes mērķis ir statiskā testā izvērtēt ūdenī šķīstošu, negaistošu organisku vielu maksimālo iespējamo bioloģiskās noārdīšanās spēju apstākļos, kad tās pakļauj relatīvi augstā koncentrācijā esošu mikroorganismu iedarbībai.

Interpretējot rezultātus (sk. 3.2. punktu), jāņem vērā tas, ka ir iespējama fizikāli ķīmiskā adsorbcija uz suspendētajām daļiņām.

Pētāmās vielas izmanto koncentrācijās, kas atbilst IOO vērtībām diapazonā no 50 līdz 400 mg/l vai ĶSP vērtībām diapazonā no 100 līdz 1 000 mg/l (IOO = izšķīdis organiskais ogleklis; ĶSP = ķīmiskais skābekļa patēriņš). Šīs koncentrācijas, lai arī relatīvi augstas, ir analītiski ticamas. Savienojumi ar toksiskām īpašībām var novilcināt vai kavēt noārdīšanās procesu.

Šajā metodē pārbaudāmās vielas maksimālās bioloģiskās noārdīšanās spējas novērtēšanai izmanto izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācijas vai ķīmiskā skābekļa patēriņa mērījumus.

Ja vienlaikus izmanto kādu īpašu analīzes metodi, ir iespējams novērtēt vielas pirmējo biodegradāciju (sākotnējās ķīmiskās struktūras izzušanu).

Šī metode piemērojama tikai tādām organiskām pārbaudāmām vielām, kurām testā izmantotajā koncentrācijā ir šādas īpašības:

— testa apstākļos tās ir ūdenī šķīstošas,

— testa apstākļos tām ir neliels tvaika spiediens,

— nav inhibējošas ietekmes uz baktērijām,

— testa sistēma tās adsorbē tikai ierobežotā apmērā,

— tās neizdalās no testa šķīduma putošanas dēļ.

Iegūto rezultātu interpretēšanā noder informācija par pārbaudāmā materiāla galveno sastāvdaļu relatīvo īpatsvaru, sevišķi tajos gadījumos, kad rezultāti ir skaitliski nelieli vai tuvi kritiskajai robežai.

Skaitliski nelielu rezultātu interpretēšanā un piemērotu testa koncentrāciju izvēlē vēlams izmantot informāciju par attiecīgās vielas toksicitāti mikroorganismiem.

1.2. **Definīcijas un vienības**

Testa beigās sasniegto noārdīšanās pakāpi sauc par "biodegradāciju Cāna-Vellena testā":

$$D_T\ (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

kur

D_T = biodegradācija (%) laikā T,

C_A = IOO (vai ĶSP) vērtības testa maisījumā, mērītas trīs stundas pēc testa sākuma (mg/l) (IOO = izšķīdis organiskais ogleklis; ĶSP = ķīmiskais skābekļa patēriņš),

C_T = IOO vai ĶSP vērtības testa maisījumā parauga ņemšanas laikā (mg/l),

C_B = IOO vai ĶSP vērtība tukšajā analīzē parauga ņemšanas laikā (mg/l),

C_{BA} = IOO vai ĶSP vērtība tukšajā analīzē, mērīta trīs stundas pēc testa sākuma (mg/l).

Noārdīšanās pakāpes vērtību noapaļo līdz tuvākajam veselajam skaitlim.

Noārdīšanās procentuālo apjomu izsaka ar IOO (vai ĶSP) procentuālo daudzumu, kas raksturo testētās vielas noārdīšanu.

Trīs stundas pēc testa sākuma izmērītās vērtības un aprēķinātās vai, vēlams, izmērītās sākotnējās vērtības starpība var sniegt noderīgu informāciju par testētās vielas noārdīšanu (sk. 3.2. punktu "Rezultātu interpretēšana").

1.3. **Standartvielas**

Dažos gadījumos, kad notiek jaunu vielu izpēte, var būt lietderīgi izmantot standartvielas, tomēr ieteikt konkrētas standartvielas pagaidām nevar.

1.4. **Testa metodes princips**

Aktīvās dūņas, barības minerālvielas un pārbaudāmo materiālu kā vienīgo oglekļa avotu ūdens šķīdumā visus kopā ievieto viena līdz četru litru tilpuma stikla traukā, kas aprīkots ar maisītāju un aeratoru. Maisījumu līdz 28 dienas ilgā laika posmā maisa un aerē 20 – 25 °C temperatūrā izkliedētā apgaismojumā vai tumšā telpā. Noārdīšanās procesu novēro, reizi dienā vai citā piemērotā un regulārā laika intervālā nosakot IOO (vai ĶSP) vērtības filtrētajā šķīdumā. Pēc katra laika intervāla izdalītā IOO (vai ĶSP) un trīs stundas pēc testa sākuma izmērītās vērtības attiecību izsaka kā biodegradācijas procentuālo apmēru un ar šo attiecību raksturo noārdīšanās pakāpi konkrētajā laika posmā. Rezultātu atliek diagrammā attiecībā pret laiku, tā iegūstot biodegradācijas līkni.

Ja izmanto kādu īpašu analīzes metodi, var mērīt biodegradācijas izraisītās izmaiņas sākotnējo molekulu koncentrācijā (pirmējā biodegradācija).

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Gredzena testā šā testa reproducējamība ir atzīta par apmierinošu.

Metodes jutību lielā mērā nosaka tukšās analīzes mainīgums un – mazākā mērā – izšķīdušā organiskā oglekļa un maisījumā esošā pārbaudāmā savienojuma koncentrācijas noteikšanas precizitāte.

1.6. **Testa metodes apraksts**

1.6.1. *Sagatavošanās testam*

1.6.1.1. Reaģenti

Testa ūdens: dzeramais ūdens, kurā organiskā oglekļa saturs ir mazāks par 5 mg/l. Kalcija un magnija jonu kopējā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 2,7 mmol/l; pretējā gadījumā jāizmanto atbilstīgs atšķaidījums ar dejonizētu vai destilētu ūdeni.

Sērskābe, analītiskais reaģents (A.R.):	50 g/l
Nātrija hidroksīda šķīduma A.R.:	40 g/l
Barības minerālvielu šķīdums; izšķīdināt vienā litrā dejonizēta ūdens:	
amonija hlorīds, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
nātrija dihidrogēnfosfāts, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A.R.:	33,4 g
kālija dihidrogēnfosfāts, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g
dikālija monohidrogēnfosfāts, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g

Maisījums izmantojams gan kā barības viela, gan kā bufersistēma.

1.6.1.2. Iekārta

Stikla trauki, kuru tilpums ir viens līdz četri litri (piem., cilindriski trauki).

Maisītājs ar stikla vai metāla maisītājierīci, kas uzmontēta uz piemērotas vārpstas (maisītājierīcei jārotē apmēram 5 – 10 cm virs trauka dibena). Tās vietā var izmantot magnētisku maisītājierīci ar 7 – 10 cm garu stienīti.

Stikla caurulīte, kuras iekšējais diametrs ir 2 – 4 mm un kura paredzēta gaisa pievadei. Caurulītes atverei jāatrodas aptuveni 1 cm virs trauka dibena.

Centrifūga (aptuveni 3 550 g).

pH mērierīce.

Izšķīdušā skābekļa mērierīce.

Papīra filtri.

Membrānfiltrācijas iekārta.

Membrānfiltri, poru izmērs 0,45 μn. Membrānfiltri ir derīgi tad, ja tie visos filtrēšanas etapos nodrošina oglekļa necaurlaidību un neabsorbē pārbaudāmo vielu.

Analītiskās iekārtas organiskā oglekļa satura un ķīmiskā skābekļa patēriņa noteikšanai.

1.6.1.3. Inokulāta sagatavošana

Aktīvās dūņas no bioloģiskajām attīrīšanas iekārtām mazgā, tās (atkārtoti) centrifugējot vai izgulsnējot testa ūdenī (sk. iepriekš).

Aktīvajām dūņām jābūt atbilstošā stāvoklī. Šādas dūņas ir pieejamas pienācīgi strādājošās notekūdeņu attīrīšanas iekārtās. Lai iegūtu pēc iespējas vairāk dažādu baktēriju sugu vai celmu, var pagatavot inokulātu maisījumu no dažādiem avotiem (piem., dažādas attīrīšanas iekārtas, augsnes ekstrakti, upes ūdeņi u.c.). Šo maisījumu jāapstrādā, kā aprakstīts iepriekš.

Informācijai par aktīvo dūņu aktivitātes testu skatīt punktu "Funkcionalitātes kontrole" turpmāk.

1.6.1.4. Testa šķīdumu sagatavošana

Testa traukā ievieto 500 ml testa ūdens, 2,5 ml/l barības minerālvielu šķīduma un aktīvās dūņas tādā daudzumā, kas atbilst no 0,2 līdz 1,0 g/l sausnas galīgajā maisījumā. Pievieno pietiekamu daudzumu pārbaudāmās vielas standartšķīduma, lai galīgajā maisījumā IOO koncentrācija būtu no 50 līdz 400 mg/l. Atbilstošā ĶSP vērtība ir no 100 līdz 1 000 mg/l. Maisījumu uzpilda ar testa ūdeni tā, lai kopējais tilpums būtu no viena līdz četriem litriem. Kopējais tilpums, kas jāizvēlas, ir atkarīgs no to paraugu skaita, kurus paredzēts ņemt, lai noteiktu IOO vai ĶSP, un no tilpumiem, kas vajadzīgi analītiskās procedūras mērķiem.

Parasti pietiek ar divu litru tilpumu. Katrā testa sērijā līdz ar citiem uzstāda vismaz vienu kontroltrauku (tukšā analīze); tajā ir tikai aktīvās dūņas un barības minerālvielu šķīdums, kas uzpildīts ar testa ūdeni līdz tādam pašam kopējam tilpumam, kāds ir testa traukos.

1.6.2. *Testa veikšana*

Testa trauku saturu 20 – 25 °C temperatūrā un izkliedētā apgaismojumā vai tumšā telpā maisa ar magnētiskām maisītājierīcēm vai ar dzenskrūvēm. Aerāciju veic ar saspiestu gaisu, ko attīra ar kokvilnas filtru un vajadzības gadījumā ar skalotni. Jānodrošina, lai dūņas neizgulsnējas un lai skābekļa koncentrācija nenoslīd zem 2 mg/l.

Regulāri (piem., katru dienu) jāpārbauda pH vērtība un vajadzības gadījumā tā jākoriģē, lai pH vērtība būtu 7 – 8.

Iztvaikošanas radītos zudumus kompensē, tieši pirms katras paraugu ņemšanas pievienojot nepieciešamo daudzumu dejonizēta vai destilēta ūdens. Laba prakse ir pirms testa sākuma uz trauka atzīmēt šķidruma līmeni. Pēc katras paraugu ņemšanas reizes (bez aerācijas un maisīšanas) izdara jaunas atzīmes. Pirmos paraugus vienmēr ņem trīs stundas pēc testa sākuma, lai šādi noteiktu aktīvo dūņu adsorbētā pārbaudāmā materiāla daudzumu.

Pārbaudāmā materiāla noārdīšanu novēro, katru dienu vai kādā citā regulārā intervālā veicot IOO vai ĶSP noteikšanu. No testa trauka un tukšās analīzes ņemtos paraugus filtrē caur rūpīgi mazgātu papīra filtru. Pirmos 5 ml testa šķīduma filtrāta izlej. Grūti filtrējamas dūņas var iepriekš atdalīt, paraugu 10 minūtes centrifugējot. IOO un ĶSP ikreiz nosaka vismaz divos atkārtojumos. Maksimālais testa ilgums ir 28 dienas.

Piezīme: Duļķainos paraugus filtrē caur membrānfiltriem. Membrānfiltri nedrīkst laist cauri vai adsorbēt nekādu organisku materiālu.

Aktīvo dūņu funkcionalitātes kontrole

Katrā testa sērijā līdz ar citiem jāuzstāda arī trauks, kurā atrodas zināma viela, lai šādi pārbaudītu aktīvo dūņu darbspēju. Šim nolūkam labi der dietilēnglikols.

Pielāgošana

Ja analīzes veic ar relatīvi īsām laika atstarpēm (piem., katru dienu), tad noārdīšanās līknē (sk. 2. attēlu) pielāgojumi ir skaidri redzami. Tādēļ testu nevajadzētu sākt tieši pirms iknedēļas brīvdienām.

Ja pielāgošana notiek testa beigās, tad testu var paildzināt, kamēr noārdīšanās beidzas.

Piezīme: Ja vajadzīgas sīkākas ziņas par pielāgoto dūņu dzīvības procesiem, tad tās pašas aktīvās dūņas vēlreiz ievieto tajā pašā pārbaudāmā materiālā saskaņā ar šādu procedūru.

Izslēdz maisītāju un aeratoru un ļauj aktīvajām dūņām nogulsnēties. Nosmeļ šķidruma virsslāni, uzpilda to ar testa ūdeni līdz divu litru tilpumam, maisa 15 minūtes un atkal ļauj nogulsnēties. Vēlreiz nosmeļ šķidruma virsslāni un, izmantojot atlikušās dūņas, atkārto testu ar to pašu materiālu, kā aprakstīts iepriekš 1.6.1.4. un 1.6.2. punktā. Aktīvās dūņas var atdalīt arī centrifugējot, nevis izgulsnējot.

Pielāgotās dūņas var samaisīt ar svaigām dūņām, lai koncentrācija būtu 0,2 – 1 g sausnas uz litru.

Analītiskie līdzekļi

Parasti paraugus filtrē caur rūpīgi mazgātu papīra filtru (mazgāšanai izmanto dejonizētu ūdeni).

Duļķainos paraugus filtrē caur membrānfiltriem (0,45 μm).

Izmantojot kopējā organiskā oglekļa (TOC) rādītāju, divos atkārtojumos nosaka IOO koncentrāciju paraugu filtrātos (pirmos 5 ml izlej). Ja filtrātu nav iespējams analizēt tajā pašā dienā, tad līdz nākamajai dienai tas jāuzglabā ledusskapī. Ilgāka uzglabāšana nav ieteicama.

ĶSP koncentrāciju nosaka paraugu filtrātos ar ĶSP analītisko gatavību un saskaņā ar izmantotās literatūras sarakstā [2] aprakstīto metodi.

2. DATI UN TO NOVĒRTĒŠANA

IOO un/vai ĶSP koncentrācijas paraugos nosaka vismaz divos atkārtojumos, kā aprakstīts iepriekš 1.6.2. punktā. Noārdīšanos laikā T aprēķina pēc formulas (pie definīcijām), kā norādīts iepriekš 1.2. punktā.

Noārdīšanās pakāpes vērtību noapaļo līdz tuvākajam veselajam skaitlim. Testa beigās sasniegto noārdīšanās pakāpi sauc par "biodegradāciju Cāna-Vellena testā".

Piezīme: Ja pilnīga noārdīšanās notikusi pirms testam atvēlētā laika beigām un ja šo rezultātu apstiprina nākamajā dienā veikta otra analīze, tad testu var beigt.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— vielas sākotnējā koncentrācija,

— visa pārējā informācija un eksperimentālie rezultāti, kas attiecas uz testēto vielu, standartvielu, ja tāda ir izmantota, un tukšo analīzi,

— vielas koncentrācija pēc trim stundām,

— biodegradācijas līkne un tās apraksts,

— testa organismu ievākšanas datums un vieta, pielāgotības statuss, izmantotā koncentrācija u.c.,

— zinātnisks pamatojums visām testa metodes izmaiņām.

3.2. Rezultātu interpretācija

IOO (ĶSP) samazināšanās, kas notiek pakāpeniski vairāku dienu vai nedēļu laikā, norāda uz to, ka pārbaudāmā viela tiek bioloģiski noārdīta.

Tomēr dažos gadījumos var izpausties fizikālķīmiskā adsorbcija, un uz to norāda pilnīga vai daļēja vielas izzušana jau no paša sākuma, pirmo trīs stundu laikā, kā arī tas, ka kontrolmaisījuma un testa maisījuma virsslāņu kvalitatīvā atšķirība saglabājas negaidīti maza.

Lai nodalītu biodegradāciju (vai daļēju biodegradāciju) no adsorbcijas, jāveic turpmāki testi.

To var veikt vairākos veidos, bet vispārliecinošākais ir izmantot šķīduma virsslāni vai dūņas par inokulātu galvenajā sarakstā iekļautā testā (vēlams, respirometriskā testā).

Pārbaudāmās vielas, kam šajā testā raksturīga stipra neadsorbējoša IOO (ĶSP) samazināšanās, uzskatāmas par potenciāli bioloģiski noārdāmām. Daļēja neadsorbējoša samazināšanās norāda uz to, ka ķīmiskā viela vismaz daļēji ir bioloģiski noārdāma. Vāju IOO (ĶSP) samazināšanos vai tās trūkumu var būt izraisījusi pārbaudāmās vielas inhibējošā iedarbība uz mikroorganismiem, uz ko norāda arī līze un dūņu zudums, kā rezultātā šķīduma virsslānis ir duļķains. Tests jāatkārto ar zemāku pārbaudāmās vielas koncentrāciju.

Lielāku jutību iespējams sasniegt, izmantojot savienojumam specifisku analīzes metodi vai ar radioaktīvo oglekli ^{14}C marķētu pārbaudāmo vielu. Ar ^{14}C marķēta pārbaudāmā savienojuma gadījumā to, ka ir notikusi biodegradācija, apstiprina $^{14}CO_2$ atgūšana.

Ja rezultāti raksturo pirmējo biodegradāciju, tad iespēju robežās jāizskaidro ķīmiskās struktūras izmaiņas, kas izraisa reakcijas zudumu sākotnējā pārbaudāmā vielā.

Analīzes metodes validācija jāsniedz kopā ar tukšajā analīzē iegūto rezultātu.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 302 B, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Pielikums V C.9 "Sadalīšanās – ķīmiskais skābekļa patēriņš", Komisijas Direktīva 84/449/EEK, *Eiropas Kopienu Oficiālais Vēstnesis*, L 251, 19.9.1984.

Papildinājums

NOVĒRTĒJUMA PIEMĒRS

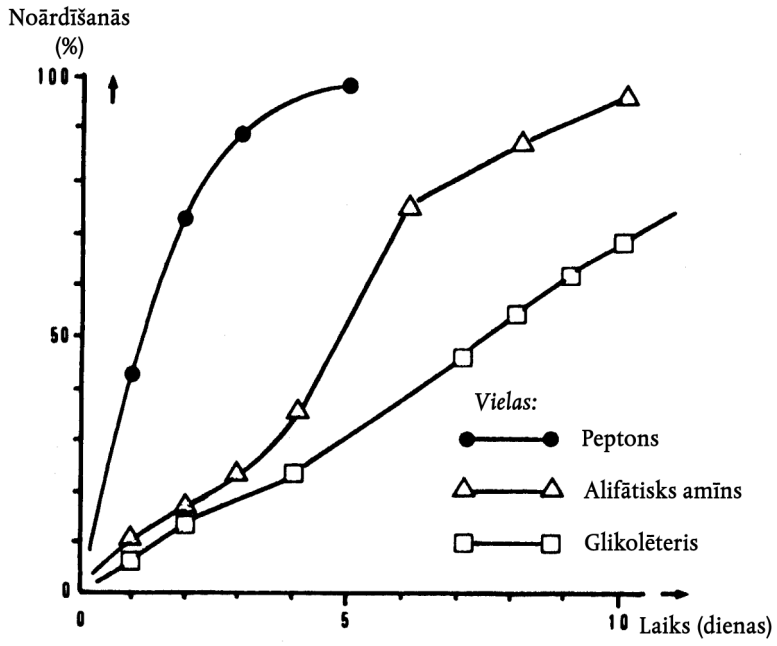
Organiskais savienojums:	4-etoksibenzoskābe
Teorētiskā testa koncentrācija:	600 mg/l
Teorētiskais IOO:	390 mg/l
Inokulāts:	…. notekūdeņu attīrīšanas iekārtas
Koncentrācija:	1 grams sausnas uz litru
Pielāgotības statuss:	nav pielāgots
Analīze:	IOO noteikšana
Parauga apjoms:	3 ml
Kontrolviela:	dietilēnglikols
Savienojuma toksicitāte:	koncentrācijā zem 1 000 mg/l toksiskas iedarbības nav Izmantotais tests: fermentācijas tests ar stobriņu metodi

Testa laiks	Kontrolviela				Pārbaudāmā viela		
	Tukšā analīze, IOO [1], mg/l	IOO [1], mg/l	IOO, tīrais, mg/l	Noārdīšanās %	IOO [1], mg/l	IOO, tīrais, mg/l	Noārdīšanās %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 stundas	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 diena	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dienas	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dienas	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dienas	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dienas	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dienas	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dienas	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dienas	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

[1] Trīskāršu atkārtojumu vidējās vērtības.

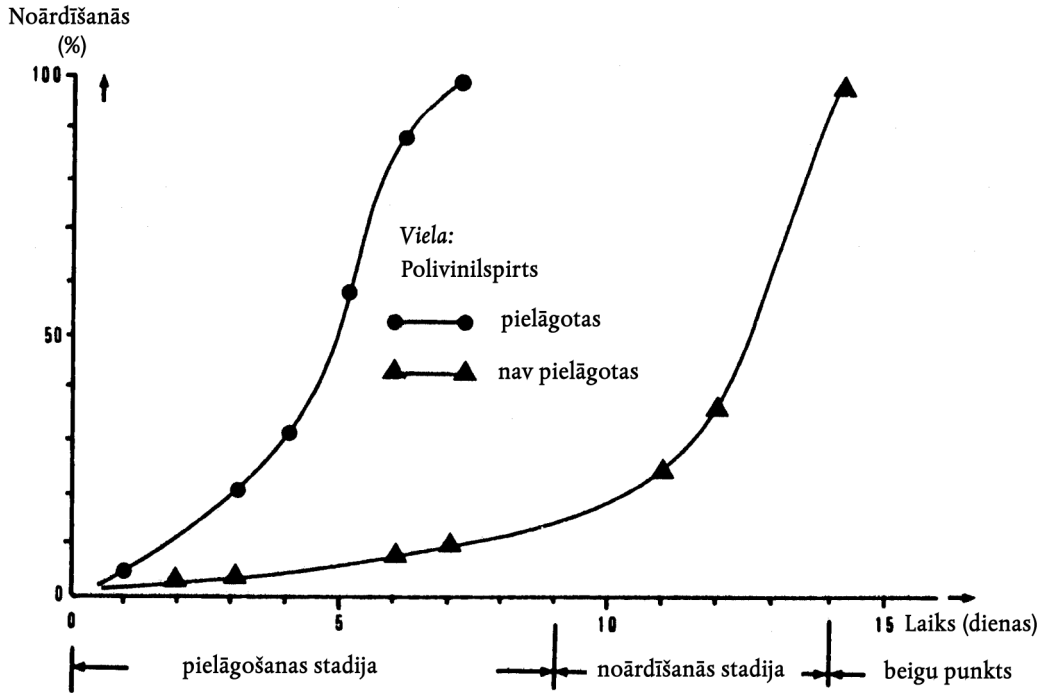
1. attēls

Biodegradācijas līkņu piemēri



2. attēls

Dūņu pielāgošanas piemēri



BIODEGRADĀCIJA

AKTĪVO DŪŅU IMITĀCIJAS TESTI

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

1.1.1. *Vispārīgas piezīmes*

Šī metode piemērojama tikai tādām organiskām vielām, kurām testā izmantotajā koncentrācijā ir šādas īpašības:

— tās šķīst ūdenī tiktāl, cik vajadzīgs testa šķīdumu sagatavošanai,

— testa apstākļos tām ir neliels tvaika spiediens,

— tām nav inhibējošas ietekmes uz baktērijām.

Iegūto rezultātu interpretēšanā noder informācija par pārbaudāmā materiāla galveno sastāvdaļu relatīvo īpatsvaru, sevišķi tajos gadījumos, kad rezultāti ir skaitliski nelieli vai tuvi kritiskajai robežai.

Skaitliski nelielu rezultātu interpretēšanā un piemērotu testa koncentrāciju izvēlē vēlams izmantot informāciju par attiecīgās vielas toksicitāti mikroorganismiem.

1.1.2. *Maksimālās bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana (IOO/ĶSP analīze)*

Šīs metodes mērķis ir noteikt maksimālo bioloģiskās noārdīšanās spēju, mērot attiecīgās vielas izzušanu un visus metabolītus aktīvo dūņu iekārtas modelī, kur pārbaudāmās vielas koncentrācija atbilst > 12 mg IOO uz litru (jeb aptuveni 40 mg ĶSP uz litru); optimālā koncentrācija varētu būt 20 mg IOO uz litru. (IOO = izšķīdis organiskais ogleklis; ĶSP = ķīmiskais skābekļa patēriņš.)

Pārbaudāmā materiālā jānosaka organiskā oglekļa saturs (vai ķīmiskais skābekļa patēriņš).

1.1.3. *Pirmējās biodegradācijas noteikšana (īpašā analīze)*

Šīs metodes mērķis ir pirmējās biodegradācijas noteikšana aktīvo dūņu iekārtas modelī ar pārbaudāmās vielas koncentrāciju aptuveni 20 mg/l, izmantojot īpašu analīzes metodi (ja analīzes metode un ar toksicitāti saistīti apsvērumi to pieļauj, var izmantot zemāku vai augstāku koncentrāciju). Tas ļauj novērtēt vielas pirmējo biodegradāciju (sākotnējās ķīmiskās struktūras izzušanu).

Šīs metodes mērķis *nav* testētās vielas mineralizācijas pakāpes noteikšana.

Jābūt pieejamai atbilstošai analīzes metodei, lai varētu noteikt testēto vielu.

1.2. **Definīcijas un vienības**

1.2.1. *IOO/ĶSP analīze*

Attiecīgās vielas noārdīšanās pakāpi nosaka pēc šādas formulas:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\ \% \qquad [1(a)]$$

kur

DR = pārbaudāmā materiāla noārdīšanās pakāpe procentos no IOO (vai ĶSP) dotajā vidējā izdalīšanas laikā;

T = pārbaudāmā materiāla koncentrācija ieplūdē, mg IOO/l (vai mg ĶSP/l),

E = IOO (vai ĶSP) koncentrācija izplūdē no testa vienības, mg IOO/l (vai mg ĶSP/l),

E_0 = IOO (vai ĶSP) koncentrācija izplūdē no tukšās vienības, mg IOO/l (vai mg ĶSP/l).

Noārdīšanos izsaka ar procentuālo IOO (vai ĶSP) samazinājumu dotajā izdalīšanas laikā attiecībā uz pārbaudāmo materiālu.

1.2.2. *Īpašā analīze*

Pārbaudāmās vielas izzušanu no ūdens fāzes (R_w) dotajā vidējā izdalīšanas laikā procentuāli aprēķina pēc šādas formulas:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

kur

C_I = vielas koncentrācija testa vienības ieplūdē (mg vielas uz litru; vērtību nosaka īpašā analīzē),

C_O = vielas koncentrācija izplūdē no testa vienības (mg vielas uz litru; vērtību nosaka īpašā analīzē).

1.3. **Standartvielas**

Dažos gadījumos, kad notiek jaunu vielu izpēte, var būt lietderīgi izmantot standartvielas, tomēr ieteikt konkrētas standartvielas pagaidām nevar.

1.4. **Testa metožu princips**

Lai noteiktu maksimālo bioloģiskās noārdīšanās spēju, vienlaikus darbina divas aktīvo dūņu eksperimentālās vienības (ESAO apstiprinošā testa vai porainā tīģeļa vienības). Pārbaudāmo vielu pievieno ieplūdei (sintētiskie vai sadzīves notekūdeņi) vienā no vienībām, kamēr otrā vienībā ieplūst tikai notekūdeņi. Pirmējās biodegradācijas noteikšanai ar īpašu ieplūdes un izplūdes analīzes metodi izmanto tikai vienu vienību.

IOO (vai ĶSP) koncentrāciju mēra izplūdē, vai arī pārbaudāmās vielas koncentrāciju nosaka īpašā analīzē.

Pārbaudāmā materiāla radīto IOO nemēra, bet vienkārši novērtē.

Veicot IOO (vai ĶSP) mērījumus, pieņem, ka testa un tukšās vienības izplūdēs vidējo koncentrāciju starpību rada nenoārdītais pārbaudāmais materiāls.

Veicot īpašās analīzes, var mērīt sākotnējo molekulu koncentrācijas izmaiņas (pirmējā biodegradācija).

Vienības var darbināt ar transinokulācijas metodi "savienoto vienību režīmā".

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Vielas sākuma koncentrācija ir atkarīga no veiktās analīzes veida un atbilstošajiem ierobežojumiem.

1.6. **Testa metodes apraksts**

1.6.1. *Sagatavošanās testam*

1.6.1.1. Iekārta

Ja neveic īpašas analīzes, tad vajadzīgas divas vienveida vienības.

Var izmantot šādu divu veidu ierīces.

ESAO apstiprinošais tests

Iekārta (1. papildinājums) sastāv no sintētisko notekūdeņu glabāšanas trauka (A), dozētājsūkņa (B), aerācijas trauka (C), nostādināšanas trauka (D), saspiesta gaisa sūkņa (E) aktīvo dūņu atkārtotai apstrādei un trauka (F) apstrādāto notekūdeņu savākšanai.

Traukiem (A) un (F) jābūt no stikla vai piemērotas plastmasas un ar vismaz 24 litru tilpumu. Sūknim (B) jānodrošina sintētisko notekūdeņu nemainīga plūsma uz aerācijas trauku; var izmantot jebkuru piemērotu sistēmu, ja vien tā nodrošina vajadzīgo ievades plūsmu un koncentrāciju. Normālos darbības apstākļos nostādināšanas trauka (D) augstums ir tāds, lai aerācijas traukā ietilptu trīs litri maisījuma. Traukā (C) konusa galotnē ir iekārts poraina stikla aerācijas kubs (G). Caur aeratoru izpūstā gaisa daudzumu var mērīt ar caurplūduma mērītāju.

Saspiesta gaisa sūkni (E) uzstāda tā, lai aktīvās dūņas no nostādināšanas trauka pastāvīgi un atkārtoti novadītu uz aerācijas trauku (C).

"Porainais tīģelis"

Poraino tīģeli darina no poraina polietilēna (biezums 2 mm, maksimālais poru izmērs 95 μn) loksnes, izveidojot no tās cilindru ar 14 cm diametru un ar konisku pamatni, kuras leņķis ir 45° (2. papildinājuma 1. un 2. attēls). Poraino tīģeli ievieto tādā necaurlaidīgā traukā no piemērotas plastmasas, kura diametrs ir 15 cm un kura cilindriskajā daļā 17,2 cm augstumā atrodas atvere, ar ko ierobežo tīģelī esošā šķidruma tilpumu (3 litri). Iekšējā trauka augšmalu apjož ciets balstošs gredzens no piemērotas plastmasas, lai veidotos 0,5 cm plata sprauga starp iekšējo un ārējo trauku.

Poraino tīģeli var uzstādīt termoregulējamā ūdens vannā. Jānodrošina gaisa piegāde iekšējā trauka pamatnē, uz kuras novieto piemērotu difuzoru.

Traukiem (A) un (E) jābūt no stikla vai piemērotas plastmasas un ar vismaz 24 litru tilpumu. Sūknim (B) jānodrošina sintētisko notekūdeņu nemainīga plūsma uz aerācijas trauku; var izmantot jebkuru piemērotu sistēmu, ja vien tā nodrošina vajadzīgo ievades plūsmu un koncentrāciju.

Jāsagādā poraino tīģeļu rezerves, lai varētu aizstāt lietošanas laikā aizsprostojušos tīģeļus; aizsprostojušos tīģeļus tīra, tos uz 24 stundām iemērcot hipohlorīta šķīdumā un pēc tam rūpīgi noskalojot ar krāna ūdeni.

1.6.1.2. Filtrācija

Membrānfiltrācijas iekārta un membrānfiltri ar poru izmēru 0,45 μn. Membrānfiltri ir derīgi tad, ja tie visos filtrēšanas etapos nodrošina oglekļa necaurlaidību un neadsorbē pārbaudāmo vielu.

1.6.1.3. Notekūdeņi

Var izmantot vai nu atbilstošu sintētisku materiālu, vai sadzīves notekūdeņus.

Sintētiska materiāla piemērs.

Jāšķīdina litrā krāna ūdens:

Peptons:	160 mg
Gaļas ekstrakts:	110 mg
Urīnviela:	30 mg
NaCl:	7 mg
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg
K_2HPO_4:	28 mg

Sadzīves notekūdeņi

Katru dienu jāievāc svaigi no pārplūdes pirmējās nostādināšanas tvertnē attīrīšanas iekārtās, kurās attīra galvenokārt sadzīves notekūdeņus.

1.6.1.4. Pārbaudāmā materiāla standartšķīdums

Jāsagatavo pārbaudāmā materiāla šķīdums (piemēram, 1 %), ko pievieno testa vienībai. Jānosaka materiāla koncentrācija, lai zinātu, kāds tilpums jāpievieno notekūdeņiem, vai arī, izmantojot otru sūkni, jāievada tieši testa vienībā ar nolūku iegūt testam vajadzīgo koncentrāciju.

1.6.1.5. Inokulāts

Piezīme: Ja izmanto sadzīves notekūdeņus, nav jēgas lietot inokulātu, kurā ir zema baktēriju koncentrācija, bet tā vietā var izmantot aktīvās dūņas.

Var izmantot dažādus inokulātus.

Turpmāk sniegti trīs atbilstošu inokulātu piemēri:

a) No otrējās izplūdes iegūts inokulāts

Inokulātu iegūst no labas kvalitātes otrējās izplūdes, ko ievāc attīrīšanas iekārtās, kurās apstrādā galvenokārt sadzīves notekūdeņus. Parauga ievākšanas un izmantošanas starplaikā izplūde jāuzglabā aerobos apstākļos. Lai iegūtu inokulātu, paraugu filtrē caur rupju filtru; pirmos 200 ml filtrāta neizmanto. Līdz izmantošanai filtrātu glabā aerobos apstākļos. Inokulāts jāizlieto tā ieguves dienā. Inokulācijai jāizmanto vismaz 3 ml.

b) Jaukts inokulāts

No otrējās izplūdes iegūts inokulāts:

skatīt aprakstu iepriekšējā daļā.

No augsnes iegūts inokulāts:

100 g dārza augsnes (auglīgas, nesterilizētas) suspendē 1 000 ml nehlorēta dzeramā ūdens. (Augsnes, kurās ir pārlieku daudz māla, smilts vai humusa, nav derīgas.) Pēc samaisīšanas suspensijai ļauj 30 minūtes nogulsnēties. Virsslāni filtrē caur rupju filtru; pirmos 200 ml filtrāta neizmanto. Filtrātu tūlīt sāk aerēt, un to turpina līdz filtrāta izmantošanai. Inokulāts jāizlieto tā ieguves dienā.

No virszemes ūdeņiem iegūts inokulāts:

Vēl citu inokulāta daļu iegūst no mezosaprobiskiem virszemes ūdeņiem. Paraugu filtrē caur rupju papīra filtru; pirmos 200 ml filtrāta neizmanto. Līdz izmantošanai filtrātu glabā aerobos apstākļos. Inokulāts jāizlieto tā ieguves dienā.

Triju inokulāta daļu paraugus vienādos daudzumos salej kopā un labi samaisa, un no šā maisījuma iegūst galīgo inokulātu. Inokulācijai jāizmanto vismaz 3 ml.

c) No aktīvajām dūņām iegūts inokulāts

Par inokulātu var izmantot aktīvo dūņu (suspendēto daļiņu saturs līdz 2,5 g/l) tilpumu (ne vairāk kā 3 l), kas ņemts no aerācijas tvertnes iekārtās, kurās attīra galvenokārt sadzīves notekūdeņus.

1.6.2. *Procedūra*

Testu veic istabas temperatūrā; tai jābūt robežās no 18 līdz 25 °C.

Ja tas ir lietderīgi, tad testu var veikt zemākā temperatūrā (līdz 10 °C); ja viela ir noārdījusies, tad parasti turpmāka darbība nav nepieciešama. Ja tomēr viela nav noārdījusies, tad tests jāveic pastāvīgā temperatūrā, kuras diapazons ir no 18 līdz 25 °C.

1.6.2.1. Piestrādes laiks: dūņu veidošanās/vienību stabilizēšanās

Dūņu augšanas/stabilizācijas periods ir laiks, kurā aktīvajās dūņās suspendēto daļiņu koncentrācija un vienību darbība konkrētajos apstākļos sasniedz stabilu stāvokli.

Piestrādes laiks ir periods, kas sākas ar brīdi, kad pārbaudāmo vielu pievieno pirmoreiz, un beidzas tad, kad šīs vielas noārdīšanās stabilizējas (sasniedz relatīvi nemainīgu vērtību). Šis laiks nedrīkst pārsniegt sešas nedēļas.

Novērtēšanas laiks ilgst trīs nedēļas, un tas sākas trīs nedēļas pēc tam, kad pārbaudāmās vielas noārdīšanās sasniedz relatīvi nemainīgu vērtību, kas parasti ir augsta. Tām vielām, kas pirmajās sešās nedēļās noārdās tikai nedaudz vai nenoārdās nemaz, novērtēšanas laiks ir vēl nākamās trīs nedēļas.

Sākotnēji uzpilda viena testa veikšanai vajadzīgās vienības ar inokulātu, kas samaisīts ar ieplūdi.

Pēc tam iedarbina aeratoru (ESAO apstiprinošā testa vienību gadījumā – arī saspiestā gaisa sūkni (E)) un dozētājierīci (B).

Pārbaudāmo vielu nesaturošas ieplūdes caurplūdei aerācijas traukā (C) jābūt vai nu vienam litram stundā, vai puslitram stundā; tas nodrošina trīs vai sešu stundu ilgu vidējo izdalīšanas laiku.

Aerācijas ātrums jāregulē tā, lai trauka (C) saturs visu laiku būtu suspendētā stāvoklī un lai izšķīdušā skābekļa saturs būtu vismaz 2 mg/l.

Ar piemērotiem līdzekļiem jānovērš putošana. Nedrīkst izmantot tādus pretputošanas līdzekļus, kam ir inhibējoša ietekme uz aktīvajām dūņām.

Dūņas, kas uzkrājušās ap aerācijas trauka (C) augšdaļu (ESAO apstiprinošā testa vienību gadījumā – arī nostādināšanas trauka (D) pamatnē un cirkulācijas sistēmā), ar suku vai ar citiem piemērotiem līdzekļiem vismaz reizi dienā jānogādā atpakaļ šķīduma maisījumā.

Ja dūņas nenogulsnējas, tad to blīvumu var palielināt, pēc vajadzības atkārtoti pievienojot 5 % trīsvērtīgās dzelzs hlorīdu porcijās pa 2 ml.

Izplūdi savāc traukā (E vai F) 20 līdz 24 stundu ilgā laikposmā, un pēc trauka satura rūpīgas samaisīšanas ņem paraugu. Trauks (E vai F) ir rūpīgi jāiztīra.

Lai uzraudzītu un kontrolētu procesa efektivitāti, ķīmisko skābekļa patēriņu (ĶSP) vai izšķīdušo organisko oglekli (IOO) uzkrātās izplūdes filtrātā mēra vismaz divreiz nedēļā, un šo pašu noteikumu attiecina arī uz filtrēto ieplūdi (filtrē ar membrānfiltru, kura poru izmērs ir 0,45 μm; filtrāta pirmos (aptuveni) 20 ml neizmanto).

ĶSP vai IOO samazinājumam būtu jāizlīdzinās pēc tam, kad vienas dienas laikā notikušās noārdīšanās apjoms daudzmaz stabilizējas.

Aktīvo dūņu sausnas saturs aerācijas tvertnē jānosaka divreiz nedēļā (g/l). Vienības var darbināt vienā no šādiem diviem veidiem: vai nu aktīvo dūņu sausnas saturu nosaka divreiz nedēļā un, ja tas pārsniedz 2,5 g/l, tad aktīvo dūņu pārpalikumu aizvāc, vai arī no katra trauka ik dienas atlej 500 ml šķīduma maisījuma, lai šādi nodrošinātu vidēji sešas dienas ilgu dūņu izdalīšanas laiku.

Kad izmērītie un aptuveni novērtētie rādītāji (procesa efektivitāte (ĶSP vai IOO samazinājums), dūņu koncentrācija, dūņu nogulsnēšanās, izplūdes duļķainums u.c.) abās vienībās ir pietiekami stabili, vienas vienības ieplūdei pievieno pārbaudāmo vielu atbilstīgi 1.6.2.2. punktam.

Cita iespēja ir pievienot pārbaudāmo vielu dūņu augšanas perioda (1.6.2.1. punkts) sākumā, jo īpaši tādā gadījumā, ja dūņas pievieno kā inokulātu.

1.6.2.2. Testa metode

Saglabā piestrādes laikā uzturētos darbības apstākļus, un testa vienības ieplūdei pievieno atbilstošu daudzumu pārbaudāmā materiāla standartšķīduma (aptuveni 1 %), lai iegūtu vēlamo pārbaudāmā materiāla koncentrāciju notekūdeņos (aptuveni 10 līdz 20 mg IOO/l vai 40 mg ĶSP/l). To var darīt, katru dienu iemaisot standartšķīdumu notekūdeņos vai izmantojot atsevišķu sūknēšanas sistēmu. Minēto koncentrāciju drīkst sasniegt pakāpeniski. Ja pārbaudāmās vielas ietekme uz aktīvajām dūņām nav toksiska, tad vielu var testēt arī augstākā koncentrācijā.

Tukšās analīzes vienībā pievieno tikai tādu ieplūdi, kuras sastāvā nav nekādas papildu vielas. Analīzes vajadzībām ņem attiecīgus izplūdes daudzumus, ko filtrē caur membrānfiltriem (0,45 μm), bet filtrāta pirmos (aptuveni) 20 ml neizmanto.

Filtrēto paraugu analīze jāveic tajā pašā dienā, pretējā gadījumā tie jāuzglabā, izmantojot piemērotu metodi, piemēram, pievienojot 0,05 ml 1 % dzīvsudraba hlorīda ($HgCl_2$) šķīduma uz katriem 10 ml filtrāta vai uzglabājot šos paraugus līdz 24 stundām 2 līdz 4 °C temperatūrā vai ilgāku laiku -18 °C un zemākā temperatūrā.

Piestrādes laiks kopā ar pārbaudāmās vielas pievienošanas laiku nedrīkst būt ilgāks par sešām nedēļām, un novērtēšanas laiks nedrīkst būt īsāks par trim nedēļām, t.i., galīgais rezultāts jāaprēķina, pamatojoties uz aptuveni 14 līdz 20 noteikšanas reizēm.

Savienoto vienību režīms

Vienību savienošanu panāk, reizi dienā divās vienībās veicot apmaiņu ar 1,5 litriem šķīduma maisījuma (tostarp dūņām) no aktīvo dūņu aerācijas traukiem. Izteikti absorbējošu pārbaudāmo materiālu gadījumā šos 1,5 litrus ņem tikai no šķīduma virsslāņa nostādināšanas traukā un pārlej otrās vienības aktīvo dūņu traukā.

1.6.2.3. Analīze

Lai novērotu vielas pārmaiņas, var veikt divu veidu analīzes.

IOO un ĶSP

IOO koncentrācijas nosaka divkārt, izmantojot oglekļa analizatoru un/vai ĶSP vērtības atbilstīgi izmantotajai literatūrai [2].

Īpašā analīze

Testētās vielas koncentrācijas nosaka ar piemērotu analīzes metodi. Ja iespējams, jāveic dūņu absorbētās vielas īpaša noteikšana.

2. DATI UN TO NOVĒRTĒŠANA

2.1. Savienoto vienību režīms

Izmantojot "savienoto vienību režīmu", vienā dienā notikušā samazinājuma pakāpi GRD aprēķina saskaņā ar 1.2.1. punktu.

Šo vienā dienā notikušā samazinājuma pakāpi GRD koriģē līdz vērtībai GRD_C, kurā atspoguļo transinokulācijas dēļ radušos materiāla pārnesi un kuru trīs stundu ilgam vidējam izdalīšanas laikam precizē ar vienādību [2], bet sešu stundu ilgam vidējam izdalīšanas laikam – ar vienādību [3]:

$$DRc = \frac{8}{7}\ DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3}\ DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Aprēķina DR_C vērtību sērijas vidējo vērtību, kā arī standartnovirzi atbilstīgi vienādībai [4]:

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}\ \left(D\overline{R} - DRc_i\right)^2}{n - 1}} \quad [4]$$

kur

S_{DRC} = DR_C vērtību sērijas standartnovirze,

$D\overline{R}$ = DR_C vērtības vidējā vērtība,

n = noteikšanas reižu skaits.

Netipisko datu kopas GRD_C sērijās izslēdz saskaņā ar atbilstīgu statistikas procedūru, piem., Naļimova metodi [6], ar 95 % varbūtību un vēlreiz aprēķina vidējo vērtību un standartnovirzi GRD_C datu kopai, no kuras izslēgti netipiskie dati.

Pēc tam aprēķina galīgo rezultātu saskaņā ar vienādību [5].

$$DRc = D\overline{R} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}\ s_{DRc}} \quad [5]$$

kur

$t_{n-1};\alpha$ = tabula nolasāma t vērtība attiecībā pret n pāriem E un E_0 vērtību un statistisko ticamību P (P = 1 - α), kur P ir 95 % [1].

Rezultātu norāda kā vidējo vērtību ar pielaides robežu 95 % varbūtības līmenī, attiecīgo standartnovirzi un datu daudzumu GRD_C datu kopā bez netipisko datu kopām, un netipisko datu kopu daudzumu, piemēram,

DR_C = 98,6 ± 2,3 % izdalītā IOO,

s = 4,65 % izdalītā IOO,

n = 18,

x = netipisko datu kopu daudzums.

2.2. **Nesavienoto vienību režīms**

Šo vienību darbību var pārbaudīt šādi:

$$\text{IOO vai ĶSP procentuālais samazinājums} = \frac{\text{notekūdeņu IOO vai ĶSP} - \text{izplūdes IOO vai ĶSP}}{\text{notekūdeņu IOO vai ĶSP}} \times 100$$

Šos vienā dienā notikušos samazinājumus var attēlot grafiski, lai noteiktu tendences, piemēram, aklimatizācijā.

2.2.1. *ĶSP/IOO noteikšanas izmantošana*

Vienā dienā notikušā samazinājuma pakāpi GRD aprēķina saskaņā ar 1.2.1. punktu.

Aprēķina GRD vērtību sērijas vidējo vērtību; bez tam aprēķina tās standartnovirzi pēc formulas:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}\ \left(D\overline{R} - DR_i\right)^2}{n - 1}} \quad [6]$$

kur

S_{DR} = DR_i vērtību sērijas standartnovirze,

$D\overline{R}$ = DR_i vērtību vidējā vērtība,

n = noteikšanas reižu skaits.

Netipisko datu kopas GRD sērijās izslēdz saskaņā ar atbilstīgu statistikas procedūru, piem., Naļimova metodi [6], ar 95 % varbūtību un vēlreiz aprēķina vidējo vērtību un standartnovirzi GRD datu kopai, no kuras izslēgti netipiskie dati.

Pēc tam aprēķina galīgo rezultātu saskaņā ar vienādību [7].

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}\, s_{DR}} \quad [7]$$

kur

$t_{n-1};\alpha$ = tabula nolasāma t vērtība attiecībā pret n pāriem E un E_0 vērtību un statistisko ticamību P (P = 1 - α), kur P ir 95 % [1].

Rezultātu norāda kā vidējo vērtību ar pielaides robežu 95 % varbūtības līmenī, attiecīgo standartnovirzi un datu daudzumu GRD datu kopā bez netipisko datu kopām, un netipisko datu kopu daudzumu, piemēram,

DR = (98,6 ± 2,3) % izdalītā IOO,

s = 4,65 % izdalītā IOO,

n = 18,

x = netipisko datu kopu daudzums.

2.2.2. *Īpašas analīzes izmantošana*

Pārbaudāmās vielas procentuālo zudumu ūdens fāzē (R_w) aprēķina saskaņā ar 1.2.2. punktu.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— veidlapa, kura pievienota 3. papildinājumā un kurā norāda testa norises apstākļus,

— testa iekārta (ESAO apstiprinošā testa iekārta vai porainais tīģelis),

— ekspluatācijas metode: savienoto vienību režīms vai cits režīms,

— notekūdeņi: sintētiskie vai sadzīves; sadzīves notekūdeņu gadījumā jānorāda parauga ņemšanas datums un vieta,

— inokulāta veids, norādot parauga ņemšanas datumu un vietu,

— paziņojums un analīzes metodes apraksts, ja tikušas veiktas kādas īpašas analīzes,

— diagramma, kurā attēlota IOO vai ĶSP samazināšanās atkarībā no laika, kā arī norādīts piestrādes laiks un novērtēšanas laiks,

— pārbaudāmās vielas analītiska atgūšana IOO vai ĶSP veidā standartšķīdumā,

— īpašu analīžu veikšanas gadījumā – diagramma, kurā procentuāli ataino testētās vielas izzušanu ūdens fāzē atkarībā no laika (piestrādes un novērtēšanas laiks),

— pārbaudāmās vielas IOO vai ĶSP vidējo samazinājumu un standartnovirzi aprēķina pēc novērtēšanas laika rezultātiem, t.i., pēc datiem, kas iegūti pārbaudāmā materiāla stabilas izdalīšanas posmā vai arī stabilas darbības posmā,

— diagramma, kurā ataino aktīvo dūņu koncentrāciju atkarībā no laika,

— piezīmes par aktīvajām dūņām (dūņu atlikuma izņemšana, apjoma palielināšanās, $FeCl_3$, u.c.), ja šādas piezīmes ir,

— testā izmantotā vielas koncentrācija,

— dūņu analīzes rezultāti, ja tādi ir,

— visa informācija un eksperimentālie rezultāti attiecībā uz testēto vielu un standartvielu, ja tāda ir izmantota,

— zinātnisks pamatojums visām izmantotās metodes izmaiņām.

3.2. **Rezultātu interpretācija**

Vāju testētās vielas samazināšanos ūdens fāzē var būt izraisījusi šīs vielas inhibējošā iedarbība uz mikroorganismiem. Uz to var norādīt arī līze un dūņu zudums, kā rezultātā šķīduma virsslānis ir duļķains, un IOO (vai ĶSP) samazinājuma efektivitātes mazināšanās eksperimentālajā iekārtā.

Dažreiz var izpausties fizikālķīmiskā adsorbcija. Molekulārā līmenī notikušas bioloģiskās iedarbības un fizikālķīmiskās adsorbcijas ietekmi var nošķirt, analizējot dūņas pēc atbilstīgas to desorbcijas.

Lai nodalītu biodegradāciju (vai daļēju biodegradāciju) no adsorbcijas, jāveic turpmāki testi.

To var veikt vairākos veidos, bet vispārliecinošākais ir izmantot šķīduma virsslāni par inokulātu galvenajā sarakstā iekļautā testā (vēlams, respirometriskā testā).

Ja novēro stipru IOO vai ĶSP samazinājumu, tad tas ir biodegradācijas dēļ, bet vāja samazinājuma gadījumā biodegradāciju nav iespējams atšķirt no vielas izdalīšanas. Piemēram, ja šķīstošam savienojumam ir augsta adsorbcijas konstante – 98 % un dūņu atlikuma zudums ir 10 % dienā, tad ir iespējama vielas izdalīšana līdz 40 % apmērā; ja dūņu atlikuma zudums ir 30 %, tad vielas izdalīšana dēļ adsorbcijas uz atlikušajām dūņām vai dēļ izvadīšanas kopā ar atlikušajām dūņām var sasniegt 65 % [4].

Veicot īpašu analīzi, jāpievērš uzmanība vielas struktūras un izmantotās īpašās analīzes metodes saistībai. Šajā gadījumā novēroto parādību nevar interpretēt kā vielas mineralizāciju.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 303 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

2. Pielikums V C.9 "Sadalīšanās tests – ķīmiskais skābekļa patēriņš", Komisijas Direktīva 84/449/EEK, *Eiropas Kopienu Oficiālais Vēstnesis*, 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.

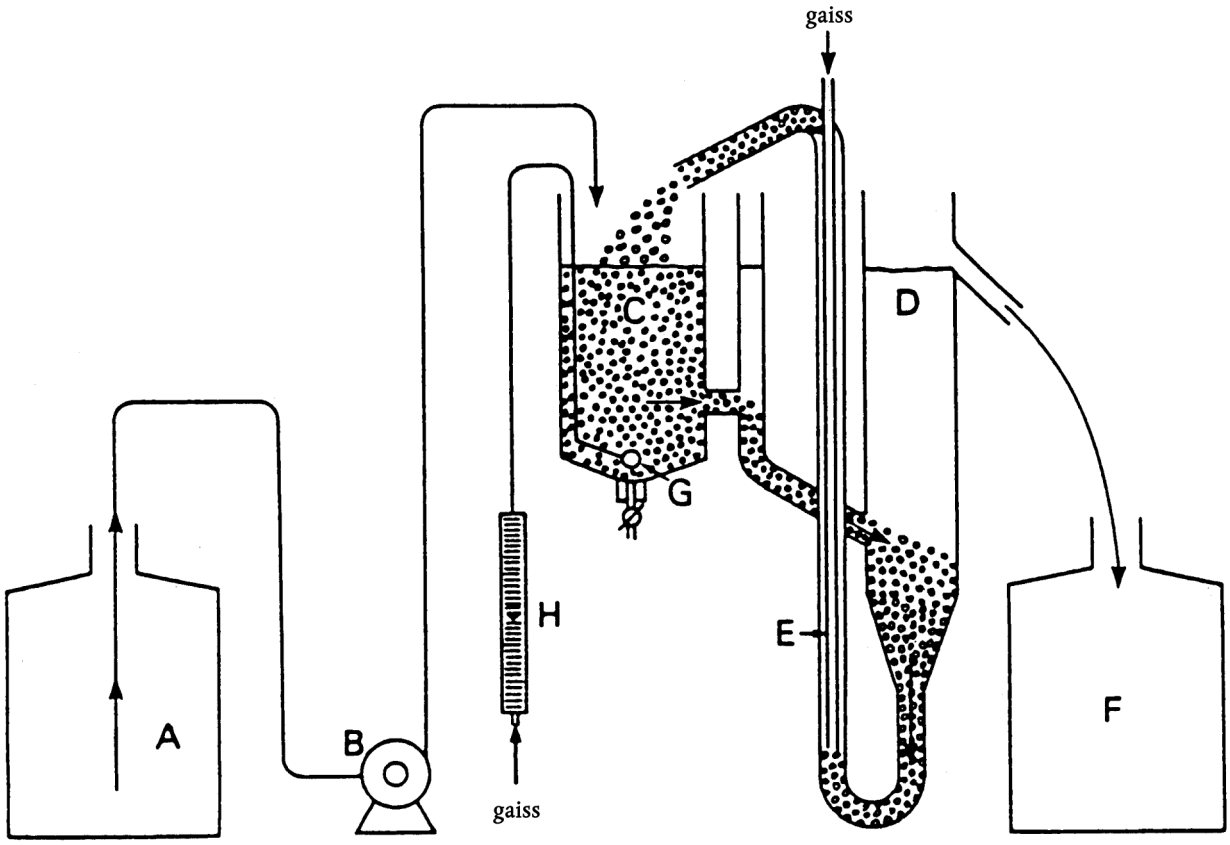
4. Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, 161. līdz 171. lpp.

5. Padomes Direktīvas 82/242/EEK un 82/243/EEK, *Eiropas Kopienu Oficiālais Vēstnesis*, L 109, 22.4.1982., ar ko groza Padomes Direktīvas 73/404/EEK un 73/405/EEK par mazgāšanas līdzekļu bioloģiskās noārdīšanās spēju, *Eiropas Kopienu Oficiālais Vēstnesis*, L 347, 17.12.1973.

6. Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), 406. līdz 408. lpp.

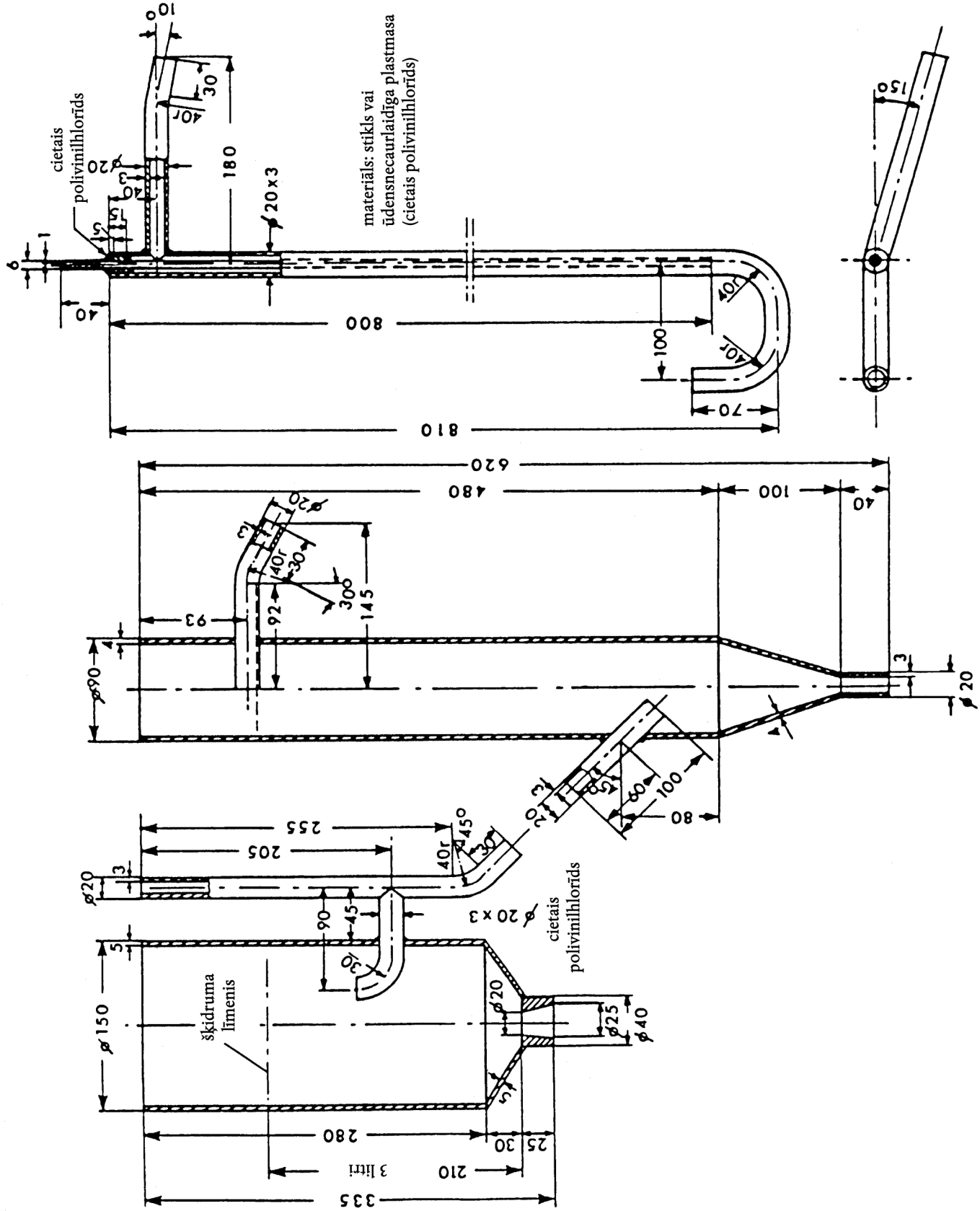
1. Papildinājums

1. attēls



Atšifrējums: A: glabāšanas trauks;
B: dozētājierīce;
C: aerācijas kamera (tilpums 3 litri);
D: nostādināšanas trauks;
E: saspiesta gaisa sūknis;
F: kolektors;
G: aerators;
H: gaisa plūsmas mērītājs (nav obligāts).

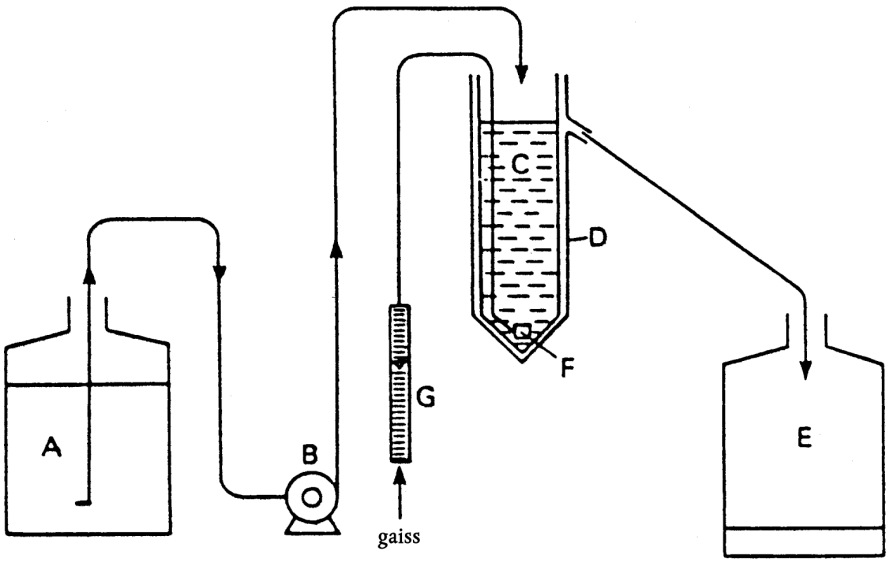
2. attēls


cietais polivinilhlorīds
materiāls: stikls vai ūdensnecaurlaidīga plastmasa (cietais polivinilhlorīds)
20 x 3
180
800
810
620
480
100
145
92
93
90
255
205
45°
cietais polivinilhlorīds
20 x 3
šķidruma līmenis
280
210
3 litri
335

2. Papildinājums

1. attēls

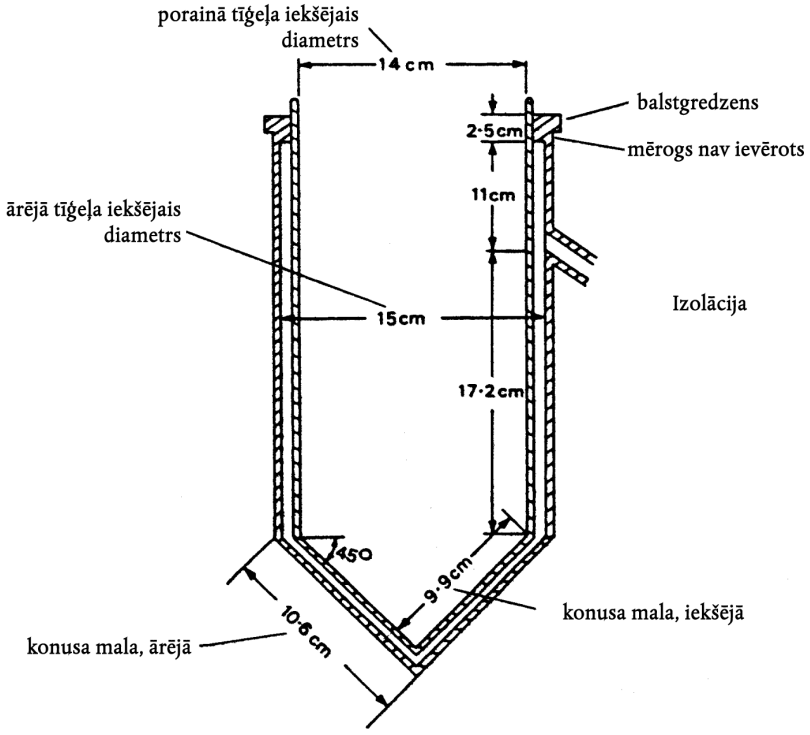
Iekārta bioloģiskās noārdīšanās spējas novērtēšanai



Atšifrējums:
A: glabāšanas trauks;
B: dozētājsūknis;
C: porainais aerācijas trauks;
D: ārējais necaurlaidīgais trauks;
E: trauks izplūdes savākšanai;
F: aerācijas difuzors;
G: rotametrs (nav obligāts).

2. attēls

Trīslitru porainā tīģeļa aerācijas trauka daļas



3. papildinājums

Aktīvo dūņu imitācijas testa norises apstākļi

Atzīmēt katrā grupā

Iekārta

ESAO apstiprinošā testa iekārta ☐

Porainais tīģelis ☐

Darbības režīms

Viena vienība ☐

Savienotas vienības ☐

Nesavienotas vienības ☐

Transinokulācija

Nav notikusi ☐

Aktīvās dūņas ☐

Šķīduma augšējais slānis ☐

Vidējais izdalīšanas laiks

Trīs stundas ☐

Sešas stundas ☐

Pamata barotne

Sadzīves notekūdeņi ☐

Sintētiskie notekūdeņi ☐

Inokulāts

Otrējās izplūdes inokulāts ☐

Jaukts inokulāts ☐

Aktīvās dūņas ☐

Pārbaudāmais materiāls pievienots

No paša sākuma ☐

Pakāpeniski pieaugošā daudzumā ☐

Pēc dūņu izveidošanās ☐

Analīze

Īpašā ☐

ĶSP ☐

IOO ☐

BIODEGRADĀCIJA

AKTĪVO DŪŅU RESPIRĀCIJAS INHIBĪCIJAS TESTS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Ar šo metodi novērtē pārbaudāmās vielas ietekmi uz mikroorganismiem, noteiktos apstākļos mērot to elpošanas intensitāti dažādās pārbaudāmās vielas koncentrācijās.

Šīs metodes mērķis ir nodrošināt ātras analīzes metodi, ar ko iespējams identificēt vielas, kuras var kaitīgi ietekmēt aerobos organismus mikrobioloģiskajās attīrīšanas iekārtās, un noteikt neinhibējošas pārbaudāmo vielu koncentrācijas izmantošanai biodegradācijas testos.

Pirms galīgā testa veikšanas var noteikt iedarbības diapazonu. Šādi iegūst informāciju par pamata testā izmantojamo koncentrāciju diapazonu.

Plānojot testu, testa sēriju sākumā un beigās paredz pa vienai kontrolanalīzei, kurā nav pārbaudāmās vielas. Visas aktīvo dūņu partijas turklāt jāpārbauda ar standartvielu.

Šo metodi visērtāk ir piemērot ūdenī šķīstošām un slikti gaistošām vielām, kuras paliek ūdenī.

Iespējams, ka vielām, kuru šķīdība testa vidē ir ierobežota, nevarēs noteikt EK_{50}.

Ja pārbaudāmai vielai raksturīga oksidatīvās fosforilācijas atvienošana, tad rezultāti, kas pamatoti ar skābekļa uzņemšanu, var radīt kļūdainus secinājumus.

Testa veikšanas nolūkā ir lietderīgi ievākt šādu informāciju par pārbaudāmo vielu:

— šķīdība ūdenī,

— tvaika spiediens,

— struktūrformula,

— tīrība.

Ieteikums

Aktīvo dūņu sastāvā var būt patogēni mikroorganismi, un tāpēc ar tām jārīkojas uzmanīgi.

1.2. **Definīcijas un vienības**

Elpošanas intensitāte ir aerobās dūņās esošo notekūdeņu mikroorganismu skābekļa patēriņš, ko parasti izsaka kā mg O_2 uz mg dūņu stundā.

Lai aprēķinātu pārbaudāmās vielas inhibējošo ietekmi kādā konkrētā koncentrācijā, elpošanas intensitāti izsaka procentuāli no abās kontrolanalīzēs reģistrētās elpošanas intensitātes vidējās vērtības:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{per cent inhibition}$$

kur

R_s = skābekļa patēriņa intensitāte tajā pārbaudāmās vielas koncentrācijā, kuru pārbauda,

R_{C1} = skābekļa patēriņa intensitāte, 1. Kontrolanalīze,

R_{C2} = skābekļa patēriņa intensitāte, 2. kontrolanalīze.

Šajā metodē EK_{50} ir pārbaudāmās vielas koncentrācija, pie kuras elpošanas intensitāte ir 50 % no tās, ko šajā metodē aprakstītajos apstākļos reģistrē kontrolanalīzē.

1.3. **Standartvielas**

Ieteicams par standartvielu izmantot 3,5-dihlorfenolu, kas ir plaši zināms elpošanas inhibitors, un ar to noteikt EK_{50} visās aktīvo dūņu partijās, lai šādi pārbaudītu, vai dūņu jutība ir normas robežās.

1.4. **Testa metodes princips**

Standartdaudzumā sintētisko notekūdeņu barotnes ievietotu aktīvo dūņu elpošanas intensitāti mēra pēc 30 minūšu vai trīs stundu ilga saskares laika vai abos šajos laikos. Turklāt elpošanas intensitāti vienām un tām pašām aktīvajām dūņām mēra identiskos apstākļos, bet dažādās pārbaudāmās vielas koncentrācijās. Noteiktā koncentrācijā esošas pārbaudāmās vielas inhibējošo ietekmi izsaka procentuāli no abās kontrolanalīzēs reģistrētās elpošanas intensitātes vidējās vērtības. Izmantojot dažādās koncentrācijās iegūtās vērtības, aprēķina EK_{50} vērtību.

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Testa rezultāti ir derīgi, ja:

— elpošanas intensitātes vērtības abās kontrolanalīzēs neatšķiras par vairāk kā 15 %,

— EK_{50} vērtība (pēc 30 minūtēm un/vai trim stundām) 3,5-dihlorfenolam ir pieļaujamajā diapazonā no 5 līdz 30 mg/l.

1.6. **Testa metodes apraksts**

1.6.1. *Reaģenti*

1.6.1.1. Pārbaudāmās vielas šķīdumi

Pārbaudāmās vielas šķīdumus gatavo tieši pirms testa, izmantojot standartšķīdumu. Ja izmanto turpmāk ieteikto metodi, tad piemērota standartšķīduma koncentrācija ir 0,5 g/l.

1.6.1.2. Kontrolanalīzē izmantojamās vielas šķīdums

3,5-dihlorfenola šķīdumu var sagatavot, piemēram, izšķīdinot 0,5 g 3,5-dihlorfenola 10 mililitros 1M NaOH, šķīdumu uzpildot ar destilētu ūdeni līdz aptuveni 30 ml tilpumam, tajā iemaisot tik daudz 0,5M H_2SO_4, ka sāk izkrist nogulsnes – vajadzēs apmēram 8 mililitrus 0,5M H_2SO_4 – un visbeidzot šo maisījumu uzpildot ar destilētu ūdeni līdz viena litra tilpumam. Iegūtā šķīduma pH vajadzētu būt diapazonā no 7 līdz 8.

1.6.1.3. Sintētiskie notekūdeņi

Sintētisko notekūdeņu barotni gatavo, vienā litrā ūdens izšķīdinot šādus vielas daudzumus:

— 16 g peptona,

— 11 g gaļas ekstrakta,

— 3 g urīnvielas,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgS0_4.7H_20$,

— 2,8 g K_2HP0_4.

1. piezīme: Šie sintētiskie notekūdeņi ir simtkāršs to notekūdeņu koncentrāts, kas aprakstīti ESAO tehniskajā ziņojumā "Ieteicamā metode sintētiskajos mazgāšanas līdzekļos izmantoto virsmas aktīvo vielu bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšanai" (1976. gada 11. jūnijs) un kam pievienots dikālija hidrogēnfosfāts.

2. piezīme: Ja sagatavoto barotni neizmanto tūlīt, tad to uzglabā tumšā vietā 0 līdz 4 °C temperatūrā ne ilgāk kā vienu nedēļu un tādos apstākļos, kas neizraisa nekādas izmaiņas barotnes sastāvā. Pirms novietošanas glabāšanā barotni turklāt var sterilizēt, vai arī peptonu un gaļas ekstraktu var pievienot tieši pirms testa sākuma. Pirms lietošanas barotni rūpīgi samaisa un koriģē pH.

1.6.2. *Iekārta*

Mēriekārta: nav būtiski lietot noteiktas konstrukcijas mēriekārtu. Tomēr tai jābūt ar augšējo tilpumu, un aizbāznim cieši jāpieguļ mērkolbas kakliņam.

Vajadzīgs parastais laboratorijas aprīkojums un jo īpaši:

— mēriekārta,

— aerācijas ierīce,

— pH elektrods un mēraparatūra,

— O_2 elektrods.

1.6.3. *Inokulāta sagatavošana*

Šajā testā par mikrobiālo inokulātu izmanto aktīvās dūņas no notekūdeņu attīrīšanas iekārtām, kurās attīra galvenokārt sadzīves notekūdeņus.

Vajadzības gadījumā pēc dūņu nogādāšanas laboratorijā no tām var atdalīt rupjās daļiņas, ļaujot dūņām neilgu laiku, piem., 15 minūtes, izgulsnēties un tad nolejot augšējo slāni ar smalkākajām daļiņām. Cita iespēja ir dūņas dažas sekundes maisīt ar elektrisko maisītāju.

Turklāt, ja ir pamats uzskatīt, ka dūņu sastāvā ir inhibējošs materiāls, tad tās jāmazgā krāna ūdenī vai izotoniskā šķīdumā. Pēc izgulsnēšanas ar centrifūgu nolej virsējo slāni (procedūru atkārto trīs reizes).

Nosver un izkaltē nelielu daudzumu minēto dūņu. Pamatojoties uz šo rezultātu, var aprēķināt mitro dūņu daudzumu, kas jāsuspendē ūdenī, lai iegūtu aktīvās dūņas, kuru maisījumā suspendēto daļiņu daudzums ir no 2 līdz 4 g/l. Šādi iegūtā koncentrācija testa barotnē ir no 0,8 līdz 1,6 g/l, ja izmanto turpmāk ieteikto metodi.

Ja dūņas nevar izmantot to ievākšanas dienā, tad uz katru litru aktīvo dūņu, kas sagatavotas, kā aprakstīts iepriekš, pievieno 50 ml sintētisko notekūdeņu; tad maisījumu vienu nakti aerē 20 ± 2 °C temperatūrā. Pēc tam to turpina aerēt, lai izmantotu tajā pašā dienā. Pirms lietošanas pārbauda pH un vajadzības gadījumā to koriģē līdz pH vērtībai 6 – 8. Maisījumā suspendēto daļiņu daudzumu jānosaka, kā aprakstīts šā punkta iepriekšējā daļā.

Ja nepieciešams turpmākajās (ne vairāk kā četrās) dienās izmantot to pašu dūņu partiju, tad katras darba dienas beigās pievieno vēl 50 ml sintētisko notekūdeņu barotnes uz litru dūņu.

1.6.4. *Testa veikšana*

Ilgums/saskares laiks:	30 minūtes un/vai trīs stundas, kuru laikā veic aerāciju
Ūdens:	dzeramais ūdens (vajadzības gadījumā dehlorēts)
Gaisa piegāde:	tīrs gaiss bez naftas produktu piejaukuma. Gaisa plūsmai jābūt no 0,5 līdz 1 l/min
Mēriekārta:	kolba ar plakanu dibenu, piemēram, BSP kolba
Skābekļa mērītājs:	piemērots skābekļa elektrods ar pašrakstītāju
Barības vielu šķīdums:	sintētiskie notekūdeņi (sk. iepriekš)
Pārbaudāmā viela:	pārbaudāmo šķīdumu gatavo tieši pirms testa sākuma
Standartviela:	piemēram, 3,5-dihlorfenols (vismaz trīs koncentrācijas)
Kontrolanalīze:	inokulēts paraugs bez pārbaudāmās vielas
Temperatūra:	20 ± 2 °C.

Ieteicamā eksperimentālā metode, ko var piemērot gan pārbaudāmai vielai, gan standartvielai trīs stundu ilgajā saskares laikā, ir izklāstīta turpmāk.

Izmanto vairākus traukus (piemēram, vārglāzes ar 1 litra tilpumu).

Jāizmanto vismaz piecas koncentrācijas, kuru izkliedes faktors ir nemainīgs un, vēlams, ne lielāks par 3,2.

Laikā "0" 16 mililitrus sintētisko notekūdeņu barotnes uzpilda ar ūdeni līdz 300 ml tilpumam. Pievieno 200 ml mikrobiālā inokulāta un visu maisījumu (500 ml) pārlej pirmajā traukā (pirmā kontrolanalīze C_1).

Testa traukus vajag pastāvīgi aerēt, lai nodrošinātu, ka izšķīdušā O_2 koncentrācija ir ne mazāka par 2,5 mg/l un ka tieši pirms elpošanas intensitātes mērījuma nolasīšanas O_2 koncentrācija ir aptuveni 6,5 mg/l.

Laikā "15 minūtes" (15 minūtes ir brīvi noteikts, taču ērts laika intervāls) atkārto iepriekš aprakstīto procedūru, mainās tikai tas, ka 16 mililitriem sintētisko notekūdeņu vispirms pievieno 100 ml pārbaudāmās vielas standartšķīduma un tad šķīdumu uzpilda ar ūdeni līdz 300 ml tilpumam un pievieno mikrobiālo inokulātu, kopā iegūstot 500 ml tilpumu. Pēc tam šo maisījumu pārlej otrajā traukā un aerē, kā aprakstīts iepriekš. Šo procesu atkārto ik pēc 15 minūtēm, izmantojot dažādus pārbaudāmās vielas standartšķīduma tilpumus, lai iegūtu virkni trauku, kuros pārbaudāmā viela ir dažādās koncentrācijās. Visbeidzot sagatavo otro kontrolanalīzi (C_2).

Pēc trim stundām nosaka pH, labi samaisa pirmā trauka saturu un tā paraugu ielej mērierīcē, un līdz 10 minūšu ilgā laika posmā mēra elpošanas intensitāti.

Šo noteikšanu atkārto ar katra trauka saturu, ievērojot 15 minūšu intervālu, un tā, lai katrā traukā saskares laiks būtu trīs stundas.

Tādā pašā veidā pārbauda standartvielu visās mikrobiālā inokulāta partijās.

Ja mērījumi jāveic pēc 30 saskares minūtēm, tad vajadzīgs cits režīms (piemēram, vairāk nekā viens skābekļa mērītājs).

Ja nepieciešams veikt ķīmiskā skābekļa patēriņa mērījumus, tad sagatavo vēl citus traukus ar pārbaudāmo vielu, sintētisko notekūdeņu barotni un ūdeni, bet bez aktīvajām dūņām. Skābekļa patēriņu mēra un reģistrē pēc 30 minūšu un/vai trīs stundu ilgas aerēšanas (saskares laiks).

2. DATI UN TO NOVĒRTĒŠANA

Elpošanas intensitāti aprēķina pēc pašrakstītāja zīmēm, kas atbilst koncentrācijai no aptuveni 6,5 mg O_2/l līdz 2,5 mg O_2/l, vai pēc 10 minūšu ilga laika posma, kurā elpošanas intensitāte ir zema. Tai elpošanas līknes daļai, pēc kuras mēra elpošanas intensitāti, jābūt lineārai.

Ja elpošanas intensitātes vērtības abās kontrolanalīzēs atšķiras par vairāk nekā 15 % vai ja standartvielas EK_{50} (30 minūtes un/vai trīs stundas) vērtība ir ārpus pieņemtā diapazona (3,5-dihlorfenolam tas ir 5 līdz 30 mg/l), tad tests nav derīgs, un tas ir jāatkārto.

Inhibīcijas procentuālo daudzumu aprēķina katrai testa koncentrācijai (sk. 1.2. punktu). Inhibīcijas procentuālo daudzumu attiecībā pret koncentrāciju atliek logaritmiski normālā (vai logaritmiski varbūtīgā) diagrammā un no tās nosaka EK_{50} vērtību.

95 % ticamības robežas EK_{50} vērtībām var noteikt ar standartmetodēm.

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— pārbaudāmā viela: ķīmiskās identifikācijas dati,

— testa sistēma: aktīvo dūņu avots, koncentrācija un pirmapstrāde, ja tāda ir veikta,

— testa apstākļi:

  — reakcijas maisījuma pH pirms elpošanas intensitātes mērījuma,

  — testa temperatūra,

  — testa ilgums,

  — standartviela un izmērītā EK_{50} vērtība šai vielai,

  — abiotiskais skābekļa patēriņš (ja ir),

— rezultāti:

  — visi mērījumu dati,

  — inhibīcijas līkne un EK_{50} aprēķina metode,

  — EK_{50} un, ja iespējams, 95 % ticamības robežas, EK_{20} un EK_{80},

  — visi novērojumi un tās atkāpes no šīs testa metodes, kuras var būt ietekmējušas rezultātu.

3.2. Datu interpretācija

EK_{50} vērtība jāuztver vienīgi kā norāde uz pārbaudāmās vielas iespējamo toksicitāti attiecībā pret notekūdeņu attīrīšanas iekārtu aktīvajām dūņām vai pret notekūdeņu mikroorganismiem, jo laboratorijas apstākļos nav iespējams precīzi imitēt dabīgajā vidē notiekošās sarežģītās mijiedarbības. Turklāt pārbaudāmās vielas, kuru iedarbība uz amonjaka oksidēšanos var būt inhibējoša, var veidot arī netipiskas inhibīcijas līknes. Attiecīgi šādu līkņu interpretēšanā jāievēro piesardzība.

4. **IZMANTOTĀ LITERATŪRA**

1. Starptautiskais standarts *ISO 8192-1986*.

2. Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, 165. lpp.

3. Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, 245. lpp.

4. ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Ieteicama metode* Nr. 103, kas arī aprakstīta:

5. Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, 80. lpp.

6. Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, 247. lpp.

7. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 209, Decision of the Council C(81) 30 final.

BIODEGRADĀCIJA

MODIFICĒTS *SCAS* TESTS

1. **METODE**

1.1. **Ievads**

Šīs metodes mērķis ir ilgstošā laikposmā izvērtēt ūdenī šķīstošu, negaistošu organisku vielu maksimālo iespējamo bioloģiskās noārdīšanās spēju apstākļos, kad tās pakļauj relatīvi augstā koncentrācijā esošu mikroorganismu iedarbībai. Šajā laikā mikroorganismu dzīvotspēju uztur, ik dienas pievienojot to barotnei izgulsnētus notekūdeņus. (Iknedēļas brīvdienu laikā notekūdeņus var uzglabāt 4 °C temperatūrā. Cita iespēja ir izmantot sintētiskos notekūdeņus no ESAO apstiprinošā testa.)

Interpretējot rezultātus (sk. 3.2. punktu), jāņem vērā tas, ka ir iespējama fizikāļķīmiskā adsorbcija uz suspendētajām daļiņām.

Ilgstošā šķidrās fāzes aizturēšanas perioda (36 stundas) un nepastāvīgās barības vielu pievienošanas dēļ šajā testā netiek imitēti notekūdeņu attīrīšanas iekārtās esošie apstākļi. Ar dažādām testētajām vielām iegūtie rezultāti liecina par to, ka šim testam ir augsts biodegradācijas potenciāls.

Testa apstākļi ir ļoti labvēlīgi tādu mikroorganismu atlasei un/vai pielāgošanai, kas spēj noārdīt pārbaudāmo savienojumu. (Šo metodi var izmantot arī citiem testiem paredzētu aklimatizētu inokulātu ieguvei.)

Šajā metodē pārbaudāmo vielu maksimālās bioloģiskās noārdīšanās spējas novērtēšanai izmanto izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācijas mērījumus. Ieteicams IOO noteikt pēc paskābināšanas un izpūšanas, nevis kā kopējā un neorganiskā oglekļa starpību.

Vienlaikus izmantojot īpašu analīzes metodi, ir iespējams novērtēt vielas pirmējo noārdīšanos (sākotnējās ķīmiskās struktūras izzušanu).

Šī metode piemērojama tikai tādām organiskām pārbaudāmām vielām, kam testā izmantotajā koncentrācijā ir šādas īpašības:

— tās ir ūdenī šķīstošas (vismaz 20 mg izšķīdušā organiskā oglekļa uz litru),

— tām ir neliels tvaika spiediens,

— nav inhibējošas ietekmes uz baktērijām,

— to adsorbcija testa sistēmā ir nebūtiska,

— tās neizdalās no testa šķīduma putošanas dēļ.

Pārbaudāmā materiālā jānosaka organiskā oglekļa saturs.

Iegūto rezultātu interpretēšanā noder informācija par pārbaudāmā materiāla galveno sastāvdaļu relatīvo īpatsvaru, sevišķi tajos gadījumos, kad rezultāti ir skaitliski nelieli vai tuvi kritiskajai robežai.

Skaitliski nelielu rezultātu interpretēšanā un piemērotas testa koncentrācijas izvēlē var noderēt informācija par pārbaudāmās vielas toksicitāti mikroorganismiem.

1.2. **Definīcijas un vienības**

C_T = pārbaudāmās vielas koncentrācija, izteikta ar esošā vai pievienotā organiskā oglekļa saturu izgulsnējušos notekūdeņos aerācijas perioda sākumā (mg/l),

C_t = testa šķīduma virsslānī esošā izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācija aerācijas perioda beigās (mg/l),

C_c = kontrolanalīzes šķīduma virsslānī esošā izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācija aerācijas perioda beigās (mg/l).

Šajā metodē ar biodegradāciju saprot organiskā oglekļa izzušanu. Biodegradāciju var izteikt šādi.

1. Vienā dienā pievienotā vielas daudzuma procentuālais zudums D_{da}:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

kur D_{da} = vienā dienā pievienotā daudzuma noārdīšanās pakāpe.

2. Dienas sākumā esošā vielas kopējā daudzuma procentuālais zudums D_{ssd}:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\,(i+1)} + 3C_{c\,(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

kur D_{ssd} = dienas sākumā esošā vielas kopējā daudzuma noārdīšanās pakāpe;

ar indeksiem i un (i + 1) norāda mērījuma veikšanas dienu.

Vienādība 2(a) ieteicama tad, ja izplūdes IOO vērtība katru dienu ir citāda, bet vienādību 2(b) var izmantot tad, ja izplūdes IOO vērtība dažādās dienās ir relatīvi nemainīga.

1.3. **Standartvielas**

Dažos gadījumos, kad notiek jaunu vielu izpēte, var būt lietderīgi izmantot standartvielas, tomēr ieteikt konkrētu standartvielu nevar.

Dati par vairākiem gredzena testos vērtētiem savienojumiem (sk. 1. papildinājumu) sniegti galvenokārt tādēļ, lai varētu regulāri veikt metodes kalibrēšanu un lai citas metodes izmantošanas gadījumā iegūtu salīdzināmus rezultātus.

1.4. **Testa metodes princips**

No notekūdeņu attīrīšanas iekārtām ņemtās aktīvās dūņas ievieto puspārtrauktās aktīvo dūņu darbības (SCAS) vienībā. Pievieno pārbaudāmo savienojumu un izgulsnētus sadzīves notekūdeņus, un maisījumu aerē 23 stundas. Tad aerāciju pārtrauc, ļauj dūņām izgulsnēties un nolej šķīduma virsslāni.

Pēc tam aerācijas kamerā atlikušās dūņas sajauc ar nākamo pārbaudāmā savienojuma un notekūdeņu alikvoto daļu un atkārto visu ciklu.

Biodegradāciju vērtē, nosakot izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrāciju šķīduma virsslānī. Šo vērtību salīdzina ar to, kas iegūta, analizējot šķīdumu no kontrolanalīzes, kurā iepildīti tikai izgulsnētie notekūdeņi.

Ja izmanto kādu īpašu analītisku metodi, var mērīt biodegradācijas izraisītās izmaiņas sākotnējo molekulu koncentrācijā (pirmējā biodegradācija).

1.5. **Kvalitātes kritēriji**

Šīs, uz izšķīdušā organiskā oglekļa izzušanu balstītās metodes reproducējamība vēl nav noteikta. (Ir iegūti ļoti precīzi dati par stipri noārdāmu materiālu pirmējo biodegradāciju.)

Metodes jutību lielā mērā ietekmē tukšās analīzes mainīgums un – mazākā mērā – precizitāte, ar kādu katra cikla sākumā nosaka izšķīdušā organiskā oglekļa un šķīdumā esošā pārbaudāmā savienojuma koncentrāciju.

1.6. **Testa metodes apraksts**

1.6.1. *Sagatavošanās testam*

Uzstāda atbilstīgu daudzumu tīru aerācijas vienību – var izmantot arī oriģinālo 1,5 litru *SCAS* testa vienību – un gaisa pievades caurulītes (1. attēls) katrai pārbaudāmai vielai un kontrolanalīzei. Testa vienībās piegādātajam saspiestajam gaisam, kuru attīra ar kokvilnas filtru, jābūt bez organiskā oglekļa piemaisījumiem un iepriekš piesātinātam ar ūdeni, lai mazinātu iztvaikošanas radītos zudumus.

Šķīduma maisījuma paraugu ar suspendēto daļiņu koncentrāciju no 1 līdz 4 g/l ņem no aktīvo dūņu iekārtām, kurās attīra galvenokārt sadzīves notekūdeņus. Katrai aerācijas vienībai vajadzīgi apmēram 150 ml šķīduma maisījuma.

Destilētā ūdenī sagatavo pārbaudāmās vielas standartšķīdumus; vajadzīgā organiskā oglekļa koncentrācija parasti ir 400 mg/l, un tas pārbaudāmā savienojumā nodrošina oglekļa koncentrāciju 20 mg/l katra aerācijas cikla sākumā, ja vien nenotiek biodegradācija.

Ja vielas toksicitāte attiecībā pret mikroorganismiem to ļauj, var izmantot augstākas koncentrācijas.

Izmēra organiskā oglekļa koncentrāciju standartšķīdumos.

1.6.2. *Testa apstākļi*

Tests jāveic no 20 līdz 25 °C temperatūrā.

Izmanto aerobos mikroorganismus augstā koncentrācijā (suspendēto daļiņu koncentrācija no 1 līdz 4 g/l), un efektīvais aiztures laiks ir 36 stundas. Oglekli saturošais materiāls notekūdeņu barotnē ekstensīvi oksidējas, un parasti tas notiek astoņu stundu laikā pēc katra aerācijas cikla sākuma. Pēc tam atlikušajā aerācijas periodā dūņas endogēni elpo, un šajā laikā vienīgais pieejamais substrāts ir pārbaudāmais savienojums, ja vien arī tas nav viegli metabolizējams. Šīs iezīmes apvienojumā ar ik dienas atkārtotu inokulāciju, ko veic tad, ja par barotni izmanto sadzīves notekūdeņus, nodrošina ļoti labvēlīgus apstākļus gan aklimatizācijai, gan ekstensīvai biodegradācijai.

1.6.3. *Testa veikšana*

Ņem aktīvo dūņu šķīduma maisījuma paraugu no piemērotām attīrīšanas iekārtām, kurās apstrādā galvenokārt sadzīves notekūdeņus, un līdz izmantošanai laboratorijā to tur aerobos apstākļos. Visas aerācijas vienības, kā arī kontrolvienību uzpilda ar 150 ml šķīduma maisījuma (ja izmanto oriģinālo *SCAS* testa vienību, tad šeit norādītie tilpumi jāreizina ar 10) un sāk aerāciju. Pēc 23 stundām aerāciju pārtrauc un ļauj dūņām 45 minūtes nogulsnēties. Pēc kārtas atver katra trauka krānu un nolej pa 100 ml šķīduma virsslāņa. Tieši pirms izmantošanas ņem izgulsnējušos sadzīves notekūdeņu paraugu un katrā aerācijas vienībā atlikušajām dūņām pievieno pa 100 ml no šā parauga. Atsāk aerāciju. Šajā stadijā pārbaudāmos materiālus nepievieno, un vienības ik dienu papildina ar sadzīves notekūdeņu devu, kamēr šķīduma virsslānis pēc izgulsnēšanās kļūst dzidrs. Parasti tas aizņem ne vairāk kā divas nedēļas, un līdz šim laikam šķīduma virsslānī izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrācija katra aerācijas cikla beigās stabilizējas konkrētā līmenī.

Minētā laika posma beigās atsevišķajos traukos izgulsnējušās dūņas samaisa un katrā vienībā pievieno 50 ml no šādi iegūtā dūņu maisījuma.

Kontrolvienībās pievieno 95 ml izgulsnējušos notekūdeņu un 5 ml ūdens un testa vienībās pievieno 95 ml izgulsnējušos notekūdeņu un 5 ml attiecīgā pārbaudāmā savienojuma standartšķīduma (400 mg/l). Atsāk aerāciju, kuru turpina 23 stundas. Pēc tam ļauj dūņām 45 minūtes nogulsnēties, nolej šķīduma virsslāni un tajā nosaka izšķīdušā organiskā oglekļa koncentrāciju.

Iepriekš aprakstīto uzpildīšanas un noliešanas procedūru atkārto katru dienu visā testa laikā.

Pirms izgulsnēšanas var būt vajadzīgs notīrīt vienību sienas, lai novērstu cieto daļiņu uzkrāšanos virs šķidruma līmeņa. Lai novērstu nevēlamu savstarpēju sajaukšanos, katrai vienībai lieto savu skrāpi vai suku.

Ideālā gadījumā izšķīdušo organisko oglekli šķīduma virsslānī nosaka katru dienu, lai arī ir pieļaujams veikt ne tik biežas analīzes. Pirms analizēšanas šķīdumus izfiltrē caur mazgātiem 0,45 μn membrānfiltriem vai centrifugē. Membrānfiltri ir derīgi tad, ja tie visos filtrēšanas etapos nodrošina slāpekļa necaurlaidību un neabsorbē pārbaudāmo vielu. Parauga temperatūra centrifugēšanas laikā nedrīkst pārsniegt 40 °C.

Testa ilgums attiecībā uz savienojumiem, kuru bioloģiskā degradācija ir slikta vai kuri bioloģiski nenoārdās nemaz, nav noteikts, taču pieredze liecina, ka parasti tam vajadzētu ilgt vismaz 12 nedēļas un tomēr ne vairāk kā 26 nedēļas.

2. DATI UN TO NOVĒRTĒŠANA

Testa vienību un kontrolanalīžu vienību šķīdumu virsslānī esošā izšķīdušā organiskā oglekļa vērtības attēlo grafiski attiecībā pret laiku.

Biodegradācijas gadījumā vielas koncentrācija testa vienībā tuvinās vielas koncentrācijai kontrolanalīzē. Pēc tam, kad abu minēto koncentrāciju starpība trijos secīgos mērījumos ir palikusi nemainīga, veic vēl tik daudz turpmāku mērījumu, cik vajadzīgs datu statistiskai apstrādei, un aprēķina pārbaudāmās vielas procentuālo biodegradāciju (D_{da} vai D_{ssd}, sk. 1.2. punktu).

3. ZIŅOJUMA SAGATAVOŠANA

3.1. Testa ziņojums

Testa ziņojumā, ja iespējams, ietver šādu informāciju:

— visas ziņas par notekūdeņu veidu, izmantoto vienību veidu un eksperimentālajiem rezultātiem attiecībā uz testēto vielu, standartvielu, ja tāda ir izmantota, un tukšo analīzi,

— temperatūra,

— degradācijas līkne ar aprakstu, aprēķina veids (sk. 1.2. punktu),

— aktīvo dūņu un notekūdeņu ievākšanas datums un vieta, pielāgojumu statuss, koncentrācija u.c.,

— zinātnisks pamatojums visām testa metodes izmaiņām,

— paraksts un datums.

3.2. Rezultātu interpretācija

Tā kā ar šo metodi pārbaudāmās vielas nav viegli biodegradējamas, tad tas IOO samazinājums, kas noticis vienīgi biodegradācijas dēļ, parasti izpaužas pakāpeniski, vairāku dienu vai nedēļu laikā, izņemot gadījumus, kad aklimatizācija ir pēkšņa, uz ko norāda krass koncentrācijas samazinājums pēc dažām nedēļām.

Tomēr dažreiz var manāmi izpausties fizikālķīmiskā adsorbcija; par to liecina pilnīga vai daļēja pievienotā IOO izzušana jau pašā sākumā. Turpmāk notiekošais ir atkarīgs no tādiem faktoriem, kā izplūdē esošo suspendēto daļiņu adsorbcijas pakāpe un koncentrācija. Parasti IOO koncentrāciju starpība kontrolanalīzes un pārbaudāmās vielas šķīduma virsslānī, salīdzinot ar sākotnējo zemo vērtību, pakāpeniski pieaug un pēc tam šī starpība saglabājas nemainīga visu atlikušo eksperimenta laiku, ja vien nenotiek aklimatizācija.

Lai nodalītu biodegradāciju (vai daļēju biodegradāciju) no adsorbcijas, jāveic turpmāki testi. To var veikt vairākos veidos, bet vispārliecinošākais ir izmantot šķīduma virsslāni vai dūņas par inokulātu galvenajā sarakstā iekļautā testā (vēlams, respirometriskā testā).

Pārbaudāmās vielas, kam šajā testā raksturīga augsta, neadsorbējoša IOO samazināšanās, uzskatāmas par potenciāli bioloģiski noārdāmām. Daļēja neadsorbējoša samazināšanās norāda uz to, ka ķīmiskā viela vismaz daļēji ir bioloģiski noārdāma.

Vāju IOO samazināšanos vai tās trūkumu var būt izraisījusi pārbaudāmās vielas inhibējošā iedarbība uz mikroorganismiem, un to var atklāt arī līze un dūņu zudums, kā rezultātā šķīduma virsslānis ir duļķains. Tests jāatkārto ar zemāku pārbaudāmās vielas koncentrāciju.

Lielāku jutību iespējams sasniegt, izmantojot savienojumam specifisku analīzes metodi vai ar radioaktīvo oglekli ^{14}C marķētu pārbaudāmo vielu. Ar ^{14}C marķēta pārbaudāmā savienojuma gadījumā to, ka ir notikusi biodegradācija, apstiprina $^{14}CO_2$ atgūšana.

Ja rezultāti raksturo arī primāro biodegradāciju, tad iespēju robežās jāizskaidro ķīmiskās struktūras izmaiņas, kas izraisa reakcijas zudumu sākotnējā pārbaudāmā vielā.

Analīzes metodes validācija jānorāda kopā ar tukšajā analīzē iegūto rezultātu.

4. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline* 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

1. papildinājums

SCAS tests: rezultātu piemērs

Viela	C_T (mg/l)	C_t-C_f (mg/l)	Biodegradācijas procentuālais daudzums, D_{da}	Testa ilgums (dienas)
4-acetilaminobenzolsulfonāts	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilēnbenzolsulfonāts	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenols	16,9	0,8	95,3	40
Dietilēnglikols	16,5	0,2	98,8	40
Anilīns	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentāntetrakarboksilāts	17,9	3,2	81,1	120

2. PAPILDINĀJUMS

Testa iekārtas piemērs

1. attēls

