31988L0302

30.5.1988 *DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH* L 133/1

DYREKTYWA KOMISJI

z dnia 18 listopada 1987 r.

dostosowująca po raz dziewiąty do postępu technicznego dyrektywę Rady 67/548/EWG w sprawie zbliżania przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych

(88/302/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady 67/548/EWG z dnia 27 czerwca 1967 r. w sprawie zbliżania przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych odnoszących się do klasyfikacji, pakowania i etykietowania substancji niebezpiecznych [1], po raz szósty zmienioną dyrektywą 79/831/EWG [2], w szczególności jej art. 19,

a także mając na uwadze, co następuje:

artykuł 3 ust. 1 dyrektywy 67/548/EWG przewiduje, że właściwości fizyczno-chemiczne, toksyczność i ekotoksyczność substancji i preparatów ustalane są zgodnie z metodami określonymi w załączniku V;

artykuł 3 ust. 2 dyrektywy 67/548/EWG przewiduje, że rzeczywiste lub potencjalne zagrożenie dla środowiska substancjami lub preparatami jest oceniane zgodnie z cechami wyszczególnionymi w załącznikach VII i VIII;

załącznik V do wersji wprowadzonej dyrektywą Komisji 84/449/EWG [3] obecnie zawiera jedynie metody analityczne odpowiadające cechom wyszczególnionym w załączniku VII, i konieczne jest również udostępnienie metod testowania odpowiadających cechom wyszczególnionym w załączniku VIII;

przepisy niniejszej dyrektywy są zgodne z opinią Komitetu ds. Dostosowania do Postępu Technicznego Przepisów dotyczących Usunięcia Barier Technicznych w Handlu Niebezpiecznymi Substancjami i Preparatami,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Tekst Załącznika do niniejszej dyrektywy dodaje się do załącznika V do dyrektywy 67/548/EWG.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie przyjmą i opublikują przed dniem 31 grudnia 1988 r. środki niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję. Środki te Państwa Członkowskie stosują najpóźniej od dnia 30 czerwca 1989 r.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 18 listopada 1987 r.

W imieniu Komisji

Stanley CLINTON DAVIS

Członek Komisji

---

[1] Dz.U. 196 z 16.8.1967, str. 1/67.
[2] Dz.U. L 259 z 15.10.1979, str. 10.
[3] Dz.U. L 251 z 19.9.1984, str. 1.

ZAŁĄCZNIK

Metody testowania opisane w niniejszym Załączniku służą do oznaczania niektórych właściwości toksykologicznych i ekotoksykologicznych wymienionych w załączniku VIII do dyrektywy Rady 79/831/EWG. Metody analityczne właściwe dla poziomu 1 i poziomu 2 załącznika VIII zostały opisane, ale badania nie są dzielone dalej jako funkcje różnych poziomów.

SPIS TREŚCI

Strona

CZĘŚĆ B: Metody ustalania toksyczności 4

Wprowadzenie ogólne: CZĘŚĆ B 4

Badanie podchronicznej toksyczności doustnej: 90-dniowe badania dawkowania doustnego z wykorzystaniem gatunków gryzoni 8

Badanie podchronicznej toksyczności doustnej: 90-dniowe badania dawkowania doustnego z wykorzystaniem gatunków innych niż gryzonie 12

Badanie podchronicznej toksyczności skóry: 90-dniowe badania dawkowania po naniesieniu na skórę z wykorzystaniem gatunków gryzoni 16

Badanie podchronicznej toksyczności inhalacyjnej: 90-dniowe badania inhalacyjne z wykorzystaniem gatunków gryzoni 20

Badanie działania teratogennego – gryzonie i inne gatunki 24

Badanie toksyczności chronicznej 27

Badanie rakotwórczości 32

Połączone badanie toksyczności chronicznej/rakotwórczości 37

Badanie toksyczności reprodukcji jednego pokolenia 43

Badanie toksyczności reprodukcji dwóch pokoleń 47

Toksykokinetyka 51

Badanie mutagenności i badania przesiewowe na rakotwórczość 55

— Mutacja genu – *Saccharomyces cerevisiae* 55

— Badanie rekombinacji genetycznej – *Saccharomyces cerevisiae* 58

— Badanie mutacji komórek genów ssaków *in vitro* 61

— Uszkodzenie i naprawa DNA – nieregularna synteza DNA – komórki ssaków *in vitro* 64

— Test wymiany chromatyd siostrzanych *in vitro* 68

— Badania sprzężonych z płcią recesywnych cech letalnych u *Drosophila melanogaster* 71

— Badania przemiany komórkowej ssaków *in vitro* 73

— Badanie dominującego genu letalnego gryzonia 76

— Cytogenetyka komórki zarodkowej ssaków *in vivo* 79

— Test plamkowy u myszy 82

— Przenoszenie dziedziczności u myszy 85

CZĘŚĆ C: Metody ustalania ekotoksyczności 88

Wprowadzenie ogólne: Część C 88

Badanie zahamowania wzrostu alg 89

Toksyczność dżdżownic: badanie sztucznej gleby 95

Biodegradacja: Badanie Zahn-Wellens 99

Biodegradacja: Badania symulacji aktywnych szlamów 106

Biodegradacja: Badanie hamowania oddychania aktywnych szlamów 118

Biodegradacja: Zmodyfikowane badanie SCAS 123

CZĘŚĆ B: METODY OZNACZANIA TOKSYCZNOŚCI

WPROWADZENIE OGÓLNE: CZĘŚĆ B

BADANIA DŁUGOTERMINOWE

Badania podchroniczności, chroniczności i rakotwórczości.

Charakterystyka substancji testowej i mieszaniny alenicznej

Skład substancji testowej, włączając większość zanieczyszczeń, oraz jej istotne właściwości fizyczno-chemiczne, włączając stabilność, powinien być znany przed rozpoczęciem jakichkolwiek badań dotyczących toksyczności.

Właściwości fizyczno-chemiczne substancji testowej dostarczają ważnych informacji dotyczących wyboru sposobu podawania, projektowania badań toksyczności podchronicznej, chronicznej oraz rakotwórczości, a także składowania i obchodzenia się z substancją testową.

Informacje dotyczące budowy chemicznej oraz właściwości fizyczno-chemicznych mogą również dostarczać wskazań w odniesieniu do cech absorpcji za pomocą zamierzonego sposobu podawania oraz możliwości metabolicznych i dystrybucji w tkankach. Informacje dotyczące parametrów toksykokinetycznych mogą pochodzić również z poprzednich badań toksyczności i badań toksykokinetycznych.

Rozpoczęcie badań powinien poprzedzać rozwój jakiejkolwiek metody analitycznej dotyczącej jakościowego i ilościowego oznaczania substancji testowej (włączając większość zanieczyszczeń w miarę możliwości) w dozowanym środku oraz materiale biologicznym.

Zwierzęta badane: wybór gatunków i szczepów

Ponieważ niezbędne jest prowadzenie badań na zwierzętach przez większość ich okresu życia, badania będą ograniczane do gatunków łatwych w utrzymaniu i o stosunkowo krótkim okresie życia. Wysoce pożądane jest poznanie przypadku samorzutnej choroby i nowotworów w szczepie wykorzystywanego zwierzęcia, utrzymywanego w podobnych warunkach.

Szczepy powinny być dobrze scharakteryzowane oraz wolne od wad wrodzonych. Wykorzystywanie szczepów wsobnych, mieszańców F1, w tym względzie wykazuje pewne korzyści, ale w przypadku dostępności dostatecznych danych dotyczących szczepów niekrewniaczych zwierząt wywodzących się ze stad zamkniętych, są one akceptowane.

Opieka nad zwierzętami, żywienie oraz zaopatrzenie w wodę

Badania na zwierzętach prowadzone są zgodnie z przepisami krajowymi oraz uwzględniają zasady ludzkie i międzynarodowy rozwój w dziedzinie dobrostanu zwierząt.

Rygorystyczna kontrola warunków środowiskowych oraz technik właściwej opieki nad zwierzętami jest konieczna w celu uzyskania miarodajnych wyników. Czynniki takie, jak warunki przebywania zwierząt, choroby wewnętrzne, terapia aleniczna, zanieczyszczenia w pożywieniu, powietrze, woda, ściółka, oraz ogólne udogodnienia związane z opieką nad zwierzętami mogą w znacznym stopniu wpłynąć na wynik powtarzalnych badań. Ogólnie biorąc, powinno być znane działanie środków sterylizujących stosowanych w badaniach.

Pożywienie powinno spełniać wszelkie potrzeby pokarmowe badanych gatunków i nie powinno zawierać zanieczyszczeń, które mogłyby wpłynąć na wyniki badania. Pożywienie i woda powinny być dostępne bez ograniczeń z wymianą pożywienia co najmniej raz w tygodniu. Obecnie wykorzystuje się trzy rodzaje pożywienia: konwencjonalne, syntetyczne oraz różnorodne.

Niezależnie od rodzaju wybranego pożywienia, dostawca musi określić, przez okresowy monitoring wartości odżywczej, poziom substancji w pożywieniu podstawowym oraz dostarczyć te informacje do laboratorium wraz z partią danej paszy. Wskazane jest poznanie wpływu reżimu dietetycznego na metabolizm, a także rozwój nowotworów i długość życia zwierząt.

Ponadto analizy kontrolne podstawowego pożywienia mogą być przeprowadzane przez laboratorium badawcze zarówno dla części składowych pożywienia, jak i substancji niezamierzonych, włączając czynniki rakotwórcze. Po dokonaniu powyższego, wyniki analiz powinny zostać zachowane i włączone do sprawozdania końcowego dotyczącego każdej substancji testowej.

Pospolite składniki pożywienia, o których wiadomo, że wpływają rakotwórczo (np. antyutleniacze, nienasycone kwasy tłuszczowe, selen), nie powinny być obecne w szkodliwych stężeniach. Potencjalny wpływ kilku pospolitych substancji występujących w pożywieniu na ocenę stopnia rakotwórczości wymaga zwrócenia szczególnej uwagi na obecność w pożywieniu pozostałości pestycydów, związków węglowodorów chlorowanych, aromatycznych węglowodorów wielopierścieniowych, estrogenów, metali ciężkich, nitrozoaminy i mykotoksyn.

W przypadku podawania testowej substancji w wodzie lub pożywieniu, niezbędne są badania stabilności. Właściwie przeprowadzone badania stabilności i jednorodności, przed rozpoczęciem powtarzających się badań, powinny zostać wykorzystane w celu ustalenia częstotliwości przygotowywania pożywienia i wymaganego monitoringu.

W przypadku sterylizacji pożywienia, skutki takich procedur związanych z substancją testową oraz składnikami pożywienia powinny być znane. Powinny zostać przeprowadzone wszelkie właściwe dostosowania.

W trakcie prowadzenia badań nad rakotwórczością badacze powinni być świadomi potencjalnej obecności substancji zanieczyszczających w wykorzystywanej wodzie. Woda przeznaczona do spożycia przez ludzi jest ogólnie w stanie zadowalającym, a informacje o jej składzie powinny być ogólnie dostępne.

Stężenie substancji testowej w pożywieniu może wymagać dostosowania z uwagi na wzrastanie zwierząt celem utrzymania w miarę stałej dawki substancji testowej odpowiedniej do wagi ciała.

Wartość odżywcza pożywienia kontrolnego oraz pożywienia testowego powinna być jak najbardziej zbliżona. A zatem należy rozważyć wartość odżywczą substancji testowej wmieszanej w pożywienie. Doświadczenie sugeruje, iż mało prawdopodobne jest, aby zawartość 5 % testowej substancji nieodżywczej w pożywieniu znacznie zakłócało wartość odżywczą pożywienia.

1. **Badania inhalacyjne**

Nie określono limitu badań ze względu na brak możliwości oznaczenia wartości granicznej jednorazowej ekspozycji przez drogi oddechowe.

2. **Badania teratogenności**

Metoda badawcza jest głównie skierowana na podawanie dawki drogą doustną. Odmiennie, można używać innych dróg w zależności od właściwości fizycznych substancji testowej lub prawdopodobnych dróg ekspozycji człowieka. W takich przypadkach metoda badawcza powinna być odpowiednio dostosowana, biorąc pod uwagę właściwe elementy 28-dniowych metod badawczych.

3. **Toksykokinetyka**

Badania toksykokinetyczne pomagają w interpretacji oraz ocenie danych toksyczności. Niniejsze badania mają na celu wyjaśnienie szczególnych aspektów toksyczności chemicznej, a wyniki mogą pomóc w dalszych badaniach nad toksycznością. Nie jest określone, że w każdym przypadku wszystkie parametry będą wymagały ustalenia. Jedynie w rzadkich przypadkach konieczne będzie przeprowadzenie pełnej kolejności badań toksykokinetycznych (absorpcja, ekskrecja, rozdział i metabolizm). Dla niektórych związków zmiana tej kolejności może być wskazana lub wystarczające może okazać się badanie dawki jednorazowej.

Definicje

Toksykokinetyka:	nauka o absorpcji, dystrybucji, metabolizmie i ekskrecji substancji testowych;
Absorpcja:	proces (procesy) wprowadzania podawanych substancji do organizmu;
Ekskrecja:	proces (procesy) usuwania z organizmu podawanej substancji i/lub jej metabolitów;
Dystrybucja:	proces (procesy) dzielenia się wewnątrz organizmu podawanej substancji i/lub jej metabolity;
Metabolizm:	proces (procesy) zmian strukturalnych podawanej substancji w organizmie przez reakcje enzymatyczne jak i nieenzymatyczne.

4. **Badania toksyczności ostrej i podostrej na drugim gatunku**

Celem badań na drugim gatunku jest uzupełnienie wniosków wyciągniętych z badań na pierwszym gatunku.

W przypadku badań na drugim gatunku, opisana metoda badań może być wykorzystana lub dostosowana do mniejszej liczby zwierząt.

5. **Badania płodności**

W przypadku konieczności wykonania badania płodności trzeciego pokolenia, opisana metoda dla badania płodności drugiego pokolenia może zostać rozszerzona w celu objęcia nią trzeciego pokolenia.

6. **Badania mutagenności**

Dodatkowe badania mutagenności, włączając badania przesiewowe na rakotwórczość

W załączniku VIII do dyrektywy określono dodatkowe badania mutagenności lub badania przedprzesiewowe na rakotwórczość. Badania przedstawione w niniejszej sekcji mogą być ogólnie wykorzystywane celem zbadania każdego z aspektów.

Wstęp

Początkowa ocena aktywności mutagennej substancji składa się z opisu genowej (punktowej) mutacji bakterii oraz badania cytogenetycznego uszkodzenia komórek ssaków (*in vitro* lub *in vivo*); odpowiednie metody dla tych „podstawowych zestawów" badań zostały wcześniej opisane. Niniejsza sekcja dotyczy dodatkowych badań odpowiednich w celu weryfikacji i/lub rozszerzenia wyników otrzymanych w podstawowym zestawie, które mogą być wykorzystywane do wielu celów:

1. potwierdzenie wyników otrzymanych w podstawowym zestawie;

2. zbadanie punktów końcowych nie badanych w podstawowym zestawie;

3. zapoczątkowanie lub rozszerzenie badań *in vivo*.

Dla tych celów zakres opisanych badań obejmuje zarówno system eukariotyczny *in vitro*, jak i *in vivo* oraz rozszerzony zakres biologicznych punktów końcowych. Badania dostarczają informacji dotyczących punktów mutacji w organizmach bardziej złożonych niż bakteria wykorzystywana w podstawowym zestawie, oraz poszerzają zakres informacji dotyczących zdolności substancji do wywoływania aberracji chromosomowych.

Opisano również testy dotyczące punktów końcowych innych niż punkty mutacji i aberracji chromosomowych. Powyższe badania dostarczają informacji uzupełniających i mogą być stosowane odpowiednio w schematach badań.

Główną zasadą jest, że w przypadku rozważania dalszego programu badań mutagenności, dodatkowe badania powinny zostać zaprojektowane w celu dostarczenia istotnych dodatkowych informacji dotyczących wpływu substancji na mutagenność i/lub rakotwórczość.

Rzeczywiste badania, które mogą być właściwe w szczególnym przypadku, zależeć będą od wielu czynników, włączając chemiczne oraz fizyczne cechy substancji, wyniki początkowych testów bakteryjnych i cytogenetycznych, metaboliczny profil substancji, wyniki innych badań toksyczności oraz znane użycia substancji. Dlatego też ścisły harmonogram wyboru testów jest niewłaściwy ze względu na różnorodność czynników, które mogą wymagać rozważenia. Jakkolwiek, można kierować się niektórymi zasadami ogólnymi. Jeżeli badanie ma wynik pozytywny w zestawie podstawowym, dodatkowe badania powinny obejmować co najmniej jeden test umożliwiający wykrycie tego samego genetycznego punktu końcowego. Jeżeli oba testy w podstawowym zestawie były negatywne, test na mutacje genów, a także test na aberracje chromosomowe powinny zostać normalnie przeprowadzone jako dodatkowe badania. Właściwe jest również uzyskanie dodatkowych danych z testów wskaźnikowych (jak wyszczególniono poniżej).

Metody takich badań są zgrupowane poniżej, w oparciu o ich główny genetyczny punkt końcowy.

Badania mutacji genowych (punktowych)

W celu dalszego zbadania wpływu substancji związanego z produkcją mutacji genowych (punktowych), jedno lub inne badania opisane poniżej mogą okazać się właściwe:

a) przeniesienie lub odwrócenie badania mutacji, wykorzystując eukariotyczne drobnoustroje (*Saccharomyces cerevisiae*);

b) badania *in vitro* w celu zbadania mutacji przeniesionej do komórek ssaków;

c) test śmiertelności sprzężonej z recesywną płcią u *Drosopbila melanogaster*;

d) test mutacji komórki somatycznej *in vivo*: test plamkowy u myszy.

Badania nad aberracjami chromosomowymi

W celu dalszego zbadania wpływu substancji związanego z produkcją chromosomowych aberracji, właściwe może okazać się jedno lub więcej poniższych badań:

a) badania cytogenetyczne ssaków *in vivo*;

Analiza metafazalna *in vivo* komórek szpiku kostnego powinna zostać wzięta pod uwagę, jeżeli nie została zawarta w początkowej ocenie (badania „podstawowy zestaw"). Ponadto można wykonać cytogenetyczne badanie *in vivo* komórki zarodkowej;

b) badania cytogenetyczne komórek ssaków *in vitro*, jeżeli nie zostały zawarte w początkowej ocenie;

c) badania czynnika dominującego w odniesieniu do śmiertelności gryzoni;

d) badanie przenoszenia dziedziczności u myszy.

Badania wskaźnikowe wpływu na DNA

Dostępne metody dostarczają wskazówek dotyczących pewnych skutków wywieranych na DNA, ale nie mają mutagennego wpływu jako „punkt końcowy". Niniejsze badania mogą dostarczać informacji uzupełniających informacje otrzymane z badań mutagenności, i mogą być użyteczne w interpretacji takich badań. W przypadku konieczności przeprowadzenia niniejszych badań, właściwa może być jedna lub więcej z poniższych metod wykorzystujących eukariotyczne drobnoustroje komórek ssaków:

a) badanie rekombinacji genetycznej – *Saccharomyces cerevisiae*;

b) uszkodzenie i naprawa DNA – nieregularna synteza DNA – komórki ssaków (*in vitro*);

c) wymiana chromatyd siostrzanych w komórkach ssaków (*in vitro*).

Inne badania wskaźnikowe odnośnie do wpływu rakotwórczości

Dostępne są opisy przemiany komórek ssaków, które mierzą zdolność substancji do wywoływania zmian morfologicznych i związanych z zachowaniem w kultury komórkowej, które uważa się za powiązane ze złośliwymi przemianami *in vivo*. Do przemiany wykorzystywać można komórki różnego typu i kryteriów.

Ocena ryzyka skutków dziedziczności u ssaków

Istnieją dostępne metody mierzące skutki dziedziczności u ssaków wywoływane przez genowe (punktowe) mutacje (szczególne testy locus myszy ([1])) lub dotyczące chromosomowych aberracji (testy przenoszenia dziedziczności u myszy). Takie metody mogą być wykorzystywane przy określaniu ewentualnego ryzyka genetycznego danej substancji w odniesieniu do człowieka. Jednakże z uwagi na złożoność takich badań oraz dużą ilość zwierząt potrzebną do ich przeprowadzenia, w szczególności w związku z szczególnymi testami locus, przed rozpoczęciem badań wymagane jest mocne uzasadnienie ich przeprowadzenia.

([1]) Szczególne testy locus myszy (które nie zostały opisane w niniejszym dokumencie) mogą być wykorzystane w celu zmierzenia mutacji komórki zarodkowej w pierwszym pokoleniu po podaniu substancji mutagennej. Zmiany prowadzące do zmian w produktach genowych produkujących różne widoczne fenotypy mogą zostać wykryte i określone ilościowo.

TEST PODCHRONICZNEJ TOKSYCZNOŚCI DOUSTNEJ

90-DNIOWE BADANIA DAWKOWANIA DOUSTNEGO Z WYKORZYSTANIEM GATUNKÓW GRYZONI

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Substancja testowa jest podawana codziennie, doustnie, w stopniowanych dawkach, kilku grupom zwierząt badanych, jedna dawka na grupę przez okres 90 dni. W okresie ekspozycji zwierzęta są obserwowane codziennie w celu wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które padną w czasie badania, poddawane są sekcji zwłok, a na końcu badania zwierzęta pozostałe przy życiu są zabijane i również poddawane sekcji zwłok.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania, młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych.

Substancja testowa może być podawana w pożywieniu, za pomocą dozownika, w postaci kapsułek lub w wodzie pitnej. Ta sama metoda podawania substancji testowej powinna być stosowana w odniesieniu do wszystkich zwierząt podczas całego okresu badania. W przypadku użycia jakiegokolwiek nośnika lub innych dodatków w celu usprawnienia dawkowania, należy upewnić się, iż nie powodują żadnych skutków toksyczności. Dane bazowe mogą być wykorzystane odpowiednio do potrzeb.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Jeżeli nie ma przeciwwskazań, preferowanym gatunkiem jest szczur. Należy zastosować powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy młodych, zdrowych zwierząt, a podawanie dawki powinno rozpocząć się dokładnie przed rozpoczęciem szóstego tygodnia życia przez szczury, i w żadnym wypadku nie później niż po rozpoczęciu ósmego tygodnia życia. Na początku badań różnica w wadze wykorzystywanych zwierząt nie powinna przekraczać ± 20 % średniej wartości. W przypadku przeprowadzania testów podchroniczności doustnej jako wstęp do długoterminowych badań, ten sam gatunek i szczep powinny być wykorzystane w obu badaniach.

Liczba i płeć

Na każdym z poziomów dawkowania powinno być wykorzystanych co najmniej 20 zwierząt (10 samic i 10 samców). Samice powinny być niecięŻarne i takie, które nie rodziły. Jeżeli planowane są zgony zwierząt w trakcie badania, liczba zwierząt badanych powinna zostać powiększona o liczbę odpowiadającą planowanej liczbie zgonów przed zakończeniem badań. Ponadto grupa satelitarna w ilości 20 zwierząt (10 zwierząt każdej płci) może zostać poddana działaniu wysokiej dawki przez okres 90 dni i obserwowana przez 28 dni po poddaniu czynnościom badawczym, pod względem odwracalności, odporności lub opóźnionego pojawienia się toksycznych skutków.

Poziomy dawek

Powinny zostać wykorzystane co najmniej trzy dawki i dawka kontrolna. Z wyjątkiem stosowania substancji testowej, zwierzęta grupy kontrolnej powinny być traktowane w identyczny sposób co podmioty grupy badanej. W przypadku użycia nośnika w celu usprawnienia dawkowania, grupa kontrolna otrzymuje dawkowanie za pośrednictwem nośnika tak jak grupa badana oraz otrzymuje taką samą ilość nośnika co grupa otrzymująca najwyższą dawkę. Najwyższa dawka powinna wywołać skutki toksyczności, ale nie powinna powodować, lub powodować niewiele przypadków wystąpienia śmiertelności. Najniższa dawka nie powinna wywoływać żadnych objawów toksyczności. W przypadku gdy przydatne jest rozważenie ekspozycji człowieka, najniższa dawka powinna ją przekraczać. Najlepiej byłoby, gdyby średnia dawka wywoływała minimalne dające się zaobserwować skutki toksyczności. W przypadku użycia więcej niż jednej średniej dawki, dawki powinny zostać rozszerzone w celu wywołania stopniowania skutków toksyczności.

W celu umożliwienia dokonania analizy wyników badań, jakiekolwiek przypadki śmiertelności w grupach otrzymujących niskie oraz średnie dawki, oraz w grupach kontrolnych powinny być nieliczne.

W przypadku podawania substancji testowej w pożywieniu, zarówno stałe stężenie pożywienia (ppm lub mg/kilogram pożywienia), jak i stała dawka w odniesieniu do wagi ciał zwierząt mogą być zastosowane; musi zostać określone alternatywne stosowanie. W przypadku substancji podawanej za pomocą dozownika, dawki powinny być podawane o podobnych porach każdego dnia. Dawki powinny być dostosowane do odpowiednich odstępów czasu (tygodniowo lub co dwa tygodnie) w celu utrzymania stałych dawek w odniesieniu do wagi ciał zwierząt.

Test graniczny

Jeżeli 90-dniowe badanie przeprowadzone zgodnie z metodą opisaną poniżej, przy jednej dawce w wysokości 1000 mg na kilogram wagi ciała na dzień, lub przy wyższej dawce związanej z możliwą ekspozycją człowieka, nie powoduje żadnych objawów toksyczności, dalsze badanie może być uznane za niepotrzebne. W odniesieniu do substancji o niskiej toksyczności istotne jest zapewnienie, że po podaniu tej substancji w pożywieniu, ilość oraz inne właściwości zawartej substancji testowej nie zakłócają zwykłych potrzeb żywieniowych.

Okres obserwacji

Wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane codziennie, a objawowi toksyczności powinny być odnotowane podając czas ich rozpoczęcia, stopień oraz czas trwania. Czas zgonu oraz czas pojawienia się oraz czas zaniku objawów toksyczności powinny być odnotowane.

Procedura

Substancja testowa dawkowana jest zwierzętom najlepiej siedem dni w tygodniu przez okres 90 dni. Zwierzęta jakiejkolwiek grupy satelitarnej przeznaczone do obserwacji uzupełniających powinny być trzymane przez dalsze 28 dni bez podawania dawek w celu stwierdzenia odwracalności, lub odporności na skutki toksyczności.

Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany zachodzące na ich skórze i futrze, zmiany oczu i błony śluzowej, a także zmiany w układzie oddechowym, krążenia oraz autonomicznym i centralnym układzie nerwowym, aktywności somatomotorycznej oraz schematów zachowań. Raz w tygodniu należy dokonać pomiaru spożycia żywności (oraz spożycia wody jeżeli substancja testowa jest podawana w wodzie pitnej) oraz pomiaru wagi zwierząt.

Regularne obserwacje zwierząt są konieczne w celu zapewnienia, o ile to możliwe, że nie występują straty zwierząt na skutek takich przypadków, jak kanibalizm, autoliza tkanek lub nieodpowiednie umieszczenie. Na końcu okresu badania wszystkie zwierzęta pozostałe przy życiu z niesatelitarnej grupy badanej, zostają zabite i poddane sekcji zwłok. Zwierzęta konające powinny być usuwane i poddawane sekcji zwłok, kiedy zostanie to zauważone.

Wszystkie zwierzęta, włączając zwierzęta z grup kontrolnych, zwyczajowo poddawane są następującym badaniom:

a) badanie oftalmologiczne z wykorzystaniem oftalmoskopu lub podobnego sprzętu, powinno zostać przeprowadzone przed podaniem substancji testowej oraz przed zakończeniem badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, ale co najmniej na zwierzętach grupy najwyższego dawkowania i grupy kontrolnej. W przypadku wykrycia zmian w oczach należy przebadać wszystkie zwierzęta;

b) hematologia, włączając hematokryt, badanie stężenia hemoglobiny, badanie ilości krwinek czerwonych, całkowitej ilości krwinek białych i obraz białokrwinkowy, pomiar wskaźników krzepliwości krwi, takich jak czas krzepnięcia, czas protrombinowy, czas tromboplastynowy lub ilość płytek krwi powinien zostać przeprowadzony na końcu okresu badania;

c) powinno zostać przeprowadzone określenie klinicznej biochemii krwi na końcu okresu badania. Obszarami uważanymi za właściwe dla wszystkich badań są: równowaga elektrolityczna, metabolizm węglowodanów, funkcje wątroby i nerek. Wybór szczególnych badań będzie uzależniony od obserwacji sposobu działania substancji. Proponowane oznaczenia to: pomiar wapnia, fosforu, chlorku, sodu, potasu, stężenia glukozy na

czczo (z zastosowaniem okresu wstrzymania podawania pożywienia odpowiednio do gatunku zwierzęcia), transaminaza pirogronianowo-glutaminowa surowicy ([1]), transaminaza szczawiowooctowoglutamylowa surowicy ([2]), dekarboksylazy ornityny, transpeptydaza gammaglutamylowa, mocznika azotu, albuminy, kreatyny krwi całkowitej bilirubiny oraz całkowitej surowicy białka. Inne ustalenia, które mogą być niezbędne do właściwej oceny toksykologicznej, obejmują analizy lipidów, hormonów, równowagę kwasowo-zasadową, czynności metahemoglobiny i cholinoesteraza. Dodatkowa biochemia kliniczna może być zastosowana w miarę potrzeb w celu rozszerzenia badania obserwowanych skutków;

d) analiza moczu nie jest wymagana jako badanie rutynowe, ale jedynie w przypadku spodziewanej lub obserwowanej toksyczności.

Jeżeli dane bazowe są niewystarczające, należy rozważyć określenie parametrów hematologicznych i biochemii klinicznej przed rozpoczęciem dawkowania.

Sekcja zwłok

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane sekcji zwłok, która obejmuje badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszelkich otworów, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Wątroba, nerki, nadnercza i jądra powinny być zważone niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia ich wyschnięcia.

Poniższe organy i tkanki powinny być zachowane w odpowiednim pojemniku w celu ewentualnego przyszłego badania histopatologicznego: wszystkie ogólne zmiany patologiczne, mózg, włączając części rdzenia/most, móżdżek i kora mózgowa, przysadka mózgowa, tarczyca/przytarczyce, tkanki grasicy, tchawica i płuca, serce, aorta (gruczoły ślinowe), wątroba, śledziona, nerki, nadnercza, trzustka, gruczoły płciowe, macica (dodatkowe organy genitaliów), (skóra), przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, pęcherz moczowy, przedstawiciel pachowych węzłów chłonnych, (żeńskie gruczoły malene), (umięśnienie uda), nerwy obwodowe, mostek wraz ze szpikiem kostnym, (oczy), (kość udowa, włączając powierzchnie stawowe), (rdzeń kręgowy w trzech poziomach – szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy) i (gruczoły łzowe). Tkanki wymienione w nawiasach będą wymagały przebadania w przypadku powstania objawów toksyczności lub zaangażowania danych organów.

Badania histopatologiczne

a) Pełna histopatologia powinna zostać przeprowadzona na organach i tkankach zwierząt w grupie kontrolnej i grupie najwyższego dawkowania.

b) Wszelkie uszkodzenia powinny zostać zbadane.

c) Organy docelowe w innych grupach dawkowania powinny zostać zbadane.

d) Płuca zwierząt w grupach niskiego i średniego dawkowania powinny zostać poddane badaniu histopatologicznemu w celu stwierdzenia objawów infekcji, ponieważ niniejsze badanie dostarcza dogodnej analizy stanu zdrowia zwierząt. Należy również rozważyć badanie histopatologiczne wątroby i nerek we wspomnianych grupach. Przeprowadzanie dalszych badań histopatologicznych nie musi być wymagane jako rutynowe w odniesieniu do zwierząt w tych grupach, ale zawsze musi być przeprowadzane na organach, które wykazują zmiany patologiczne w grupie najwyższego dawkowania.

e) W przypadku wykorzystania grupy satelitarnej histopatologia powinna zostać przeprowadzona na tkankach i organach zidentyfikowanych jako wykazujące skutki, w grupach poddanych badaniu.

2. DANE

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli wskazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, oraz procent zwierząt wykazujących każdy z rodzajów zmian. Wyniki powinny zostać ocenione właściwą metodą statystyczną. Można zastosować jakąkolwiek uznawaną metodę statystyczną.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— gatunek, szczep, źródło, warunki środowiskowe, pożywienie,

— warunki badania,

— dawkowanie, (włączając nośnik, jeżeli został użyty) oraz ich stężenie,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę,

([1]) Obecnie znane pod nazwą aminontransferaza alaninowa surowicy.
([2]) Obecnie znane pod nazwą aminotransferaza asparaginianowa surowicy.

— brak skutków,
— czas zgonu podczas badań lub informacja, czy zwierzęta przetrwały do czasu zakończenia badań,
— opis skutków toksyczności lub innych,
— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,
— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,
— wyniki badań oftalmologicznych,
— zastosowane badania hematologiczne oraz wszystkie wyniki,
— zastosowane kliniczne badania biochemiczne oraz wszystkie wyniki (włączając wyniki wszelkich analiz moczu),
— wyniki badań sekcji zwłok,
— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,
— statystyczne ujęcie wyników, jeżeli to możliwe,
— analiza wyników,
— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE PODCHRONICZNEJ TOKSYCZNOŚCI DOUSTNEJ

90-DNIOWE BADANIA DAWKOWANIA DOUSTNEGO Z WYKORZYSTANIEM GATUNKÓW INNYCH NIŻ GRYZONIE

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne", Część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne", Część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Substancja testowa jest podawana codziennie, doustnie, w stopniowanych dawkach, kilku grupom zwierząt badanych (inne niż gryzonie), jedna dawka na grupę przez okres 90 dni. W okresie podawania dawki zwierzęta są codziennie obserwowane celem wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które padną w czasie trwania badania, poddawane są sekcji zwłok, a na końcu badania zwierzęta pozostałe przy życiu są zabijane i również poddawane sekcji zwłok.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych.

Substancja testowa może być podawana w pożywieniu, przy użyciu dozownika, w postaci kapsułek lub w wodzie pitnej. Ta sama metoda podawania substancji testowej powinna być stosowana do wszystkich zwierząt w trakcie całego okresu badania. W przypadku użycia jakiegokolwiek nośnika lub innych dodatków w celu usprawnienia dawkowania, należy upewnić się, iż nie powodują żadnych skutków toksyczności. Dane bazowe mogą być wykorzystane odpowiednio do potrzeb.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Powszechnie wykorzystywanym gatunkiem innym niż gryzonie jest pies, najlepiej o określonej rasie. Wykorzystywać można również inne gatunki. Należy wykorzystywać młode zdrowe zwierzęta i, w przypadku psa, dawkowanie powinno rozpocząć się najlepiej w czwartym do szóstym miesiącu życia, a najpóźniej do dziewiątego miesiąca życia zwierzęcia. W przypadku przeprowadzania testów podchroniczności doustnej jako wstęp do długoterminowych badań, ten sam gatunek/rasę należy wykorzystać w obu badaniach.

Liczba i płeć

Na każdym z poziomów dawkowania powinno być wykorzystanych co najmniej osiem zwierząt (cztery samice i cztery samce). Liczba zwierząt przy zakończeniu badań musi być właściwa w celu uzyskania miarodajnej oceny skutków toksyczności.

Poziomy dawek

Wymagane są co najmniej trzy dawki i dawka kontrolna. Oprócz stosowania substancji testowej, zwierzęta grupy kontrolnej należy traktować w identyczny sposób co podmioty grupy badanej. Najwyższa dawka powinna doprowadzić do skutków toksyczności, ale nie powinna spowodować przypadków śmiertelności. Najniższa dawka nie powinna powodować żadnych objawów toksyczności. W przypadku gdy przydatne jest rozważenie ekspozycji człowieka, najniższa dawka powinna ją przekraczać. Najlepiej byłoby, gdyby średnia dawka wywoływała minimalne dające się zaobserwować skutki toksyczności. W przypadku użycia więcej niż jednej średniej dawki, dawki powinny zostać rozszerzone w celu wywołania stopniowania skutków toksyczności.

W grupach otrzymujących niskie oraz średnie dawki, oraz w grupach kontrolnych, nie powinny wystąpić jakiekolwiek przypadki śmiertelności.

W przypadku podawania substancji testowej w pożywieniu, zarówno stałe stężenie pożywienia (ppm lub mg/kilogram pożywienia), jak i stała dawka w odniesieniu do wagi ciał zwierząt mogą być zastosowane; alternatywne użycie musi zostać określone.

W przypadku substancji podawanej bezpośrednio, np. w kapsułkach, dawka powinna być podawana o podobnych porach dnia i jeżeli konieczne, dostosowana do odpowiednich tygodniowych odstępów czasu w celu utrzymania stałej dawki w odniesieniu do wagi ciał zwierząt.

W przypadku stosowania testu podchroniczności jako wstęp do długotrwałych badań, w obu badaniach powinna być zazwyczaj stosowane podobne pożywienie.

Test graniczny

Jeżeli 90-dniowe badanie przeprowadzone zgodnie z metodą opisaną poniżej, przy jednej dawce w wysokości 1000 mg/kilogram wagi ciała na dzień, lub przy wyższej dawce związanej z ewentualną ekspozycją człowieka, nie daje żadnych dowodów toksyczności, dalsze badanie może być uznane za niepotrzebne. W odniesieniu do substancji o niskiej toksyczności istotne jest zapewnienie, że po podaniu takiej substancji w pożywieniu, ilość oraz inne właściwości zawartej substancji testowej nie zakłócą normalnych potrzeb żywieniowych.

Okres obserwacji

Wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane codziennie, a objawy toksyczności odnotowane, włączając czas ich rozpoczęcia, stopień oraz czas trwania. Czas zgonu i czas wystąpienia oraz zaniku objawów toksyczności powinny być odnotowane.

Procedura

Substancja testowa podawana jest zwierzętom najlepiej siedem dni w tygodniu przez okres 90 dni. Jednakże opierając się głównie na względach praktycznych, w przypadku podawania substancji inaczej niż w pożywieniu, dawkowanie przez pięć dni w tygodniu uznaje się za dopuszczalne.

Obserwacje powinny obejmować, ale nie wyłącznie, zmiany zachodzące na skórze i futrze zwierząt, zmiany oczu i błony śluzowej, a także zmiany układu oddechowego, krążenia oraz autonomicznego i centralnego układu nerwowego, czynności somatomotoryczne oraz schematy zachowań. Powinny być dokonywane pomiary spożycia żywności (oraz spożycia wody, jeżeli substancja testowa jest podawana w wodzie pitnej) oraz pomiary wagi zwierząt raz w tygodniu.

Dokładne badania kliniczne zwierząt powinny być przeprowadzane codziennie wraz z właściwymi działaniami podjętymi w celu zminimalizowania strat na zwierzętach związanych z badaniami. Na końcu okresu ekspozycji wszystkie zwierzęta pozostałe przy życiu zostają zabite i poddane sekcji zwłok. Zwierzęta konające powinny być usuwane i poddawane sekcji zwłok po stwierdzeniu takiego faktu.

Wszystkie zwierzęta, włączając zwierzęta z grup kontrolnych, zwyczajowo poddawane są następującym badaniom:

a) badanie oftalmologiczne z wykorzystaniem oftalmoskopu lub podobnego sprzętu, powinno zostać wykonane przed podaniem substancji testowej oraz zakończeniem badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, a co najmniej na zwierzętach z grupy najwyższej dawki i grupy kontrolnej. W przypadku wykrycia zmian w oczach należy przebadać wszystkie zwierzęta;

b) hematologia, włączając hematokryt, badanie stężenia hemoglobiny, badanie ilości krwinek czerwonych, całkowitej ilości krwinek białych i obraz białokrwinkowy, pomiar wskaźników krzepliwości krwi, takich jak czas krzepnięcia, czas protrombinowy, czas tromboplastynowy lub liczba płytek krwi powinny zostać przeprowadzone na początku okresu badania, następnie w odstępach miesięcznych albo w środku okresu badania i na zakończenie okresu badania;

c) powinno zostać przeprowadzone oznaczenie klinicznej biochemii krwi na początku okresu badania, a następnie w odstępach miesięcznych albo w środku okresu badania i na zakończenie okresu badania. Obszarami uważanymi za właściwe dla wszystkich badań są: równowaga elektrolityczna, metabolizm węglowodanów, funkcje wątroby i nerek. Wybór szczególnych badań uzależniony będzie od obserwacji formy i działania substancji. Sugerowane ustalenia to: pomiar wapnia, fosforu, chlorku, sodu, potasu, stężenie glukozy na czczo (z okresem wstrzymania podawania pożywienia odpowiednim dla gatunku zwierzęcia/rasy), transaminaza pirogronianowo-glutaminowa surowicy ([1]), transaminaza szczawiowooctowo-glutamylowa surowicy ([2]), dekarboksylazy ornityny, transpeptydaza gammaglutamylowa, mocznika azotu, albuminy, kreatyny krwi całkowitej bilirubiny oraz całkowitej surowicy białka. Inne ustalenia, które mogą

([1]) Obecnie znane pod nazwą aminontransferaza alaninowa surowicy.
([2]) Obecnie znane pod nazwą aminotransferaza asparaginianowa surowicy.

być niezbędne do właściwej oceny toksykologicznej obejmują analizy lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, czynności metahemoglobiny i cholinoesteraza. Dodatkowa biochemia kliniczna może zostać zastosowana w miarę potrzeb, w celu rozszerzenia badań w odniesieniu obserwowanych skutków. Gatunki inne niż gryzonie powinny być głodzone przez okres (nie dłuższy niż 24 godziny) przed pobraniem próbek krwi;

d) analiza moczu nie jest wymagana jako badanie rutynowe ale jedynie w przypadku spodziewanej lub obserwowanej toksyczności.

Sekcja zwłok

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane sekcji zwłok, która obejmuje badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszelkich otworów, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Wątroba, nerki, nadnercza, tarczyca (wraz z przytarczycami) oraz jądra powinny być zważone niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia.

Poniższe organy i tkanki powinny być zachowane w odpowiednim pojemniku w celu ewentualnego przyszłego badania histopatologicznego: wszystkie zmiany patologiczne, mózg – włączając części rdzenia/-most, móżdżek i kora mózgowa, przysadka mózgowa, tarczyca/przytarczyce, tkanki grasicy, (tchawica), płuca, serce, aorta, gruczoły ślinowe, wątroba, śledziona, nerki, nadnercza, trzustka, gruczoły płciowe, macica (dodatkowe organy genitaliów), (skóra), woreczek żółciowy, przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, pęcherz moczowy, przedstawiciel pachowych węzłów chłonnych, (żeńskie gruczoły malene), (umięśnienie uda), nerwy obwodowe, (oczy), mostek wraz ze szpikiem kostnym, (kość udowa, włączając powierzchnie stawowe) i (rdzeń kręgowy w trzech poziomach – szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy). Tkanki wymienione w nawiasach będą wymagały przebadania w przypadku powstania objawów toksyczności lub organów, na które było skierowane działanie substancji testowej.

Badanie histopatologiczne

Pełna histopatologia powinna zostać przeprowadzona na organach i tkankach zwierząt w grupie kontrolnej i w grupie najwyższego dawkowania. Dalsze badania histopatologiczne w grupach otrzymujących inne dawki powinny być przeprowadzone na organach wykazujących zmiany patologiczne w grupie wysokiego dawkowania lub w odniesieniu do których kliniczne obserwacje wskazują na taką potrzebę.

2. DANE

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wskazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, rodzaje zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy z rodzajów zmian. Wyniki powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— gatunek lub szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,

— warunki badania,

— dawkowanie, (włączając nośnik, jeżeli został użyty) oraz jego stężenie,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę,

— brak skutków w przypadkach gdy to możliwe,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia,

— opis skutków toksyczności lub innych (ze szczególną uwagą odnośnie do wyników badań klinicznych),

— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,

— wyniki badań oftalmologicznych,

— zastosowane badania hematologiczne oraz wszystkie wyniki,

— zastosowane kliniczne badania biochemiczne oraz wszystkie wyniki (włączając wyniki wszelkich analiz moczu),

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,

— statystyczne ujęcie wyników, odpowiednio do potrzeb,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2 **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne", część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE PODCHRONICZNEJ TOKSYCZNOŚCI SKÓRY

90-DNIOWE BADANIA POWTARZANEGO DAWKOWANIA NA SKÓRZE Z WYKORZYSTANIEM GATUNKÓW GRYZONI

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne", część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne", część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Substancja testowa jest nanoszona codziennie na skórę, w stopniowanych dawkach, kilku grupom zwierząt badanych, jedna dawka na grupę przez okres 90 dni. W okresie podawania dawki zwierzęta obserwowane są codziennie celem wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które padną w czasie trwania badania, poddawane są sekcji zwłok, a na zakończenie badania, zwierzęta pozostałe przy życiu są zabijane i również poddawane sekcji zwłok.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych. Tuż przed rozpoczęciem badania futro zostaje ostrzyżone w części grzbietowej tułowia badanych zwierząt. Można zastosować golenie, ale powinno być przeprowadzone około 24 godziny przed rozpoczęciem badania. Ponowne strzyżenie lub golenie jest zazwyczaj potrzebne w przybliżeniu co tydzień. Podczas strzyżenia lub golenia futra należy uważać, aby nie otrzeć skóry. Nie mniej niż 10 % powierzchni skóry powinno zostać oczyszczone w celu podania substancji testowej. Należy uwzględnić wagę zwierząt w chwili podjęcia decyzji o powierzchni oczyszczanej skóry oraz o powierzchni jej pokrycia. Badając substancje stałe, które mogą być ścierane w odpowiednich przypadkach, substancję testową powinno się odpowiednio nawilżać wodą lub, w miarę potrzeby, za pomocą odpowiedniego nośnika w celu zapewnienia dobrego kontaktu ze skórą. Płynne substancje testowe na ogół są aplikowane nierozcieńczone. Substancja aplikowana jest zasadniczo przez pięć do siedmiu dni w tygodniu.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Wykorzystywać można dorosłe szczury, króliki lub świnki morskie. W chwili rozpoczęcia badania rozpiętość różnicy wagowej powinna wynosić ± 20 % wagi średniej. W przypadku przeprowadzania podchronicznych badań na skórze jako badań wstępnych do badań długoterminowych, ten sam gatunek i szczep powinny być wykorzystane w obu badaniach.

Liczba i płeć

Co najmniej 20 zwierząt (10 samic i 10 samców) ze zdrową skórą powinno być wykorzystanych na każdym z poziomów dawek. Samice powinny być nieciężarne i takie, które nie rodziły. Jeżeli planowane są zgony zwierząt, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt planowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badań. Ponadto grupa satelitarna w ilości 20 zwierząt (10 zwierząt każdej płci) może zostać poddana wysokiej dawce przez okres 90 dni i obserwowana pod względem odwracalności, odporności, lub opóźnionego wystąpienia toksycznych skutków przez 28 dni po przeprowadzeniu czynności badawczych.

Poziomy dawek

Powinny zostać wykorzystane co najmniej trzy poziomy dawek łącznie z dawką kontrolną lub kontrolą nośnika, jeżeli jest stosowany. Okres ekspozycji na substancję powinien wynosić co najmniej sześć godzin dziennie. Substancję należy stosować o podobnych porach każdego dnia, a ilość stosowanej substancji dostosowana jest do odpowiednich odstępów czasu (tygodniowych lub dwutygodniowych), w celu utrzymania stałej dawki w odniesieniu do wagi ciała zwierząt. Oprócz stosowania substancji testowej, zwierzęta grupy kontrolnej powinny być traktowane w identyczny sposób, co obiekty grupy badanej. W przypadku użycia nośnika w celu usprawnienia dawkowania, grupa kontrolna przyjmuje dawki w ten sam sposób, co grupy badane, oraz otrzymuje tę samą ilość nośnika, co ilość podawana grupie otrzymującej najwyższą dawkę. Najwyższa dawka powinna wywołać objawy toksyczności ale nie powinna powodować, lub powodować niewiele przypadków śmiertelności. Najniższa dawka nie powinna powodować żadnych objawów toksyczności. W przypadku rozważenia ekspozycji człowieka, najniższa dawka powinna ją przekraczać. Najlepiej było by gdyby średnia dawka wywoływała minimalne, dające się zaobserwować skutki toksyczności. W przypadku użycia więcej niż jednej średniej dawki, należy rozszerzyć stosowane poziomy dawek w celu wywołania stopniowania skutków toksyczności. W grupach otrzymujących niskie oraz średnie dawki, oraz w grupach kontrolnych, jakiekolwiek przypadki śmiertelności powinny być nieliczne w celu umożliwienia dokonania miarodajnej oceny wyników badań.

W przypadku gdy aplikowanie substancji testowej powoduje poważne podrażnienia skóry, stężenie powinno zostać obniżone, co może doprowadzić do zmniejszenia lub braku innych objawów toksyczności w grupie najwyższego dawkowania. Jeżeli skóra została poważnie uszkodzona, konieczne może okazać się zakończenie bieżących badań i podjęcie nowych badań z niższymi stężeniami.

Test graniczny

Jeżeli wstępne badanie przy dawce w wysokości 1000 mg/kilogram, lub przy wyższej dawce związanej z ewentualną ekspozycją człowieka, nie wywołuje żadnych objawów toksyczności, dalsze badanie może być uznane za niepotrzebne.

Okres obserwacji

Zwierzęta badane powinny być codziennie obserwowane w celu wykrycia objawów toksyczności. Czas zgonu oraz czas pojawienia się i zaniku objawów toksyczności należy odnotować.

Procedura

Zwierzęta powinny zostać umieszczone w osobnych klatkach. Zwierzęta należy poddać działaniu substancji testowej najlepiej siedem dni w tygodniu, przez okres 90 dni.

Zwierzęta z grup satelitarnych przeznaczone do obserwacji uzupełniających powinny być trzymane przez dodatkowy okres 28 dni bez podawania jakichkolwiek substancji w celu stwierdzenia regeneracji lub odporności na skutki toksyczności. Czas ekspozycji powinien wynosić sześć godzin dziennie.

Substancja testowa powinna być aplikowana w sposób jednolity na powierzchni, która stanowi około 10 % ogólnej powierzchni ciała. W odniesieniu do substancji wysokotoksycznych, pokryty obszar powierzchni ciała może być mniejszy, ale pozostała powierzchnia powinna być pokryta tak cienką i jednolitą warstwą jak to możliwe.

W czasie ekspozycji substancja testowa wchodzi w kontakt ze skórą za pomocą porowatego opatrunku z gazy i niedrażniącej taśmy. Następnie badane miejsce powinno być w odpowiedni sposób okryte w celu utrzymania opatrunku z gazy oraz substancji testowej i zapewnienia, że zwierzę nie będzie w stanie spożyć substancji testowej. W celu zapobieżenia spożycia substancji testowej mogą zostać zastosowane środki zabezpieczające, ale całkowite unieruchomienie nie jest zalecaną metodą.

Na zakończenie okresu ekspozycji pozostała substancja testowa powinna zostać usunięta, w przypadku gdy to możliwe, za pomocą wody lub innej właściwej metody oczyszczania skóry.

Wszystkie zwierzęta powinny być obserwowane codziennie, a objawy toksyczności powinny być odnotowane, włączając porę ich rozpoczęcia, stopień oraz czas trwania. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany zachodzące na ich skórze i futrze, zmiany oczu i błony śluzowej, a także zmiany układu oddechowego, krążenia oraz autonomicznego i centralnego układu nerwowego, czynności somatomotorycznych oraz schematów zachowań. Powinny być dokonywane pomiary spożycia żywności oraz pomiary wagi ciała zwierząt raz w tygodniu. Regularne obserwacje zwierząt są konieczne w celu zapewnienia, że nie dochodzi do strat na zwierzętach w wyniku takich przypadków jak kanibalizm, autoliza tkanek lub nieprawidłowe umieszczenie. Na końcu okresu badania wszystkie zwierzęta pozostałe przy życiu z niesatelitarnej grupy badanej, zostają zabite i poddane sekcji zwłok. Zwierzęta konające powinny być usuwane i poddawane sekcji zwłok po stwierdzeniu takiego faktu.

Wszystkie zwierzęta, włączając zwierzęta z grup kontrolnych, zwyczajowo poddawane są następującym badaniom:

a) Badanie oftalmologiczne z wykorzystaniem oftalmoskopu lub podobnego sprzętu, powinno zostać przeprowadzone przed zastosowaniem substancji testowej oraz zakończeniem badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, a co najmniej na zwierzętach z grupy najwyższej dawki i grupy kontrolnej. W przypadku wykrycia zmian w oczach należy przebadać wszystkie zwierzęta.

b) Hematologia, włączając hematokryt, badanie stężenia hemoglobiny, ilości krwinek czerwonych, ogólnej ilości krwinek białych i obraz białokrwinkowy, pomiar wskaźników krzepliwości krwi, takich jak czas krzepnięcia, czas protrombinowy, czas tromboplastynowy czy ilość płytek krwi, powinny zostać zbadane na końcu okresu badania.

c) Powinno zostać przeprowadzone oznaczenie klinicznej biochemii krwi na końcu okresu badania. Obszarami zainteresowania uważanymi za właściwe dla wszystkich badań są: równowaga elektrolityczna, metabolizm węglowodanów, funkcje wątroby i nerek. Wybór szczególnych badań będzie uzależniony od obserwacji formy i działania substancji. Sugerowane ustalenia to: pomiar wapnia, fosforu, chlorku, sodu, potasu, stężenie glukozy na czczo (z okresem głodzenia stosownym do gatunku zwierzęcia), transaminaza pirogronianowo-glutaminowa surowicy ([1]), transaminaza szczawiowooctowoglutamylowa surowicy ([2]), dekarboksylazy ornityny, transpeptydaza gammaglutamylowa, mocznika azotu, albuminy, kreatyny krwi całkowitej bilirubiny oraz całkowitej surowicy białka.

Inne ustalenia, które mogą być niezbędne do właściwej analizy toksykologicznej, obejmują badania lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, czynności metahemoglobiny i cholinoesteraza. Dodatkowa biochemia kliniczna może zostać zastosowana w miarę potrzeby w celu rozszerzenia badań odnośnie do obserwowanych skutków.

d) Analiza moczu nie jest wymagana jako badanie rutynowe, ale jedynie w przypadku spodziewanej lub obserwowanej toksyczności.

Jeżeli dane bazowe są niewłaściwe, należy zwrócić uwagę na określenie parametrów hematologicznych i klinicznej biochemii przed rozpoczęciem dawkowania.

Całkowita sekcja zwłok

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane całkowitej sekcji zwłok, która obejmuje badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszelkich otworów, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Wątroba, nerki, nadnercza oraz jądra powinny być zważone niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia. Poniższe organy i tkanki powinny być zachowane w odpowiednim pojemniku w celu ewentualnego przyszłego badania histopatologicznego: wszelkie zmiany patologiczne, mózg – włączając części rdzenia/most, móżdżek i kora mózgowa, przysadka mózgowa, tarczyca/przytarczyca, tkanki grasicy, (tchawica), płuca, serce, aorta, gruczoły ślinowe, wątroba, śledziona, nerki, nadnercza, trzustka, gruczoły płciowe, macica, dodatkowe organy genitaliów, woreczek żółciowy (jeżeli obecny), przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, pęcherz moczowy, przedstawiciel pachowych węzłów chłonnych, (żeńskie gruczoły malene), (umięśnienie uda), nerwy obwodowe, (oczy), (mostek wraz ze szpikiem kostnym), (kość udowa, włączając powierzchnie stawowe), i (rdzeń kręgowy w trzech poziomach – szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy) i (oczodołowe gruczoły łzowe). Tkanki wymienione w nawiasach będą wymagały przebadania w przypadku powstania objawów toksyczności lub zaangażowania danych organów.

Badania histopatologiczne

a) Pełna histopatologia powinna zostać przeprowadzona na normalnej i badanej skórze oraz na organach i tkankach zwierząt w grupie kontrolnej i grupie najwyższego dawkowania.

b) Wszelkie zmiany patologiczne powinny zostać zbadane.

c) Organy docelowe działania substancji w grupach innego dawkowania powinny zostać zbadane.

d) W przypadku gdy wykorzystywane są szczury, płuca zwierząt w grupach niskiego i średniego dawkowania powinny zostać poddane badaniu histopatologicznemu w celu stwierdzenia dowodów infekcji, ponieważ badanie to dostarcza dogodnej analizy stanu zdrowia zwierząt. Przeprowadzanie dalszych badań histopatologicznych nie musi być wymagane jako rutynowe w odniesieniu do zwierząt w tych grupach, ale zawsze musi być przeprowadzane na organach, które wykazują objawów zmian patologicznych w grupie najwyższego dawkowania.

e) W przypadku wykorzystywania grupy satelitarnej, histopatologia powinna zostać przeprowadzona na tkankach i organach zidentyfikowanych jako te wykazujące skutki w grupach poddanych badaniu.

2. **DANE**

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wykazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, rodzaj zmian oraz procent zwierząt wykazujących każdy z rodzajów zmian. Wyniki powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

([1]) Obecnie znane pod nazwą aminontransferaza alaninowa surowicy.
([2]) Obecnie znane pod nazwą aminotransferaza asparaginianowa surowicy.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań zawiera, w miarę możliwości, następujące informacje:

— gatunek lub szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,
— warunki badania,
— dawkowanie (włączając nośnik, jeżeli został użyty) oraz jego stężenie,
— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę,
— brak skutków,
— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia,
— opis skutków toksyczności lub innych,
— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,
— brak skutków,
— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,
— wyniki badań oftalmologicznych,
— zastosowane badania hematologiczne oraz wszystkie wyniki,
— zastosowane kliniczne badania biochemiczne oraz wszystkie wyniki (włączając wyniki wszelkich analiz moczu),
— wyniki badań sekcji zwłok,
— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,
— statystyczne ujęcie wyników, jeżeli to możliwe,
— analiza wyników,
— interpretacja wyników.

3.2 **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne”, część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne”, część B.

BADANIE PODCHRONICZNEJ TOKSYCZNOŚCI INHALACYJNEJ

90-DNIOWE BADANIA INHALACYJNE Z WYKORZYSTANIEM GATUNKÓW GRYZONI

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne", Część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne", Część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Kilka grup zwierząt badanych poddane jest codziennemu oddziaływaniu substancji testowej w stopniowanych stężeniach przez wyznaczony okres czasu, jeden rodzaj stężenia jest używany w danej grupie przez okres 90 dni. W przypadku wykorzystania nośnika w celu wytworzenia właściwego stężenia substancji testowej w powietrzu, należy wykorzystać grupę kontrolną do oceny nośnika. W okresie podawania dawki zwierzęta obserwowane są codziennie celem wykrycia objawów toksyczności. Zwierzęta, które padną w czasie trwania badania, poddawane są sekcji zwłok, a przy zakończeniu badania, zwierzęta pozostałe przy życiu również należy zabić i poddać sekcji zwłok.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych. W miarę potrzeby do substancji testowej może zostać dodany odpowiedni nośnik celem wspomożenia wytworzenia właściwego stężenia substancji w powietrzu. W przypadku użycia jakiegokolwiek nośnika lub innych dodatków w celu usprawnienia dawkowania, należy upewnić się, iż nie powodują żadnych skutków toksyczności. Dane bazowe mogą być wykorzystane stosownie do potrzeb.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Jeżeli nie ma przeciwwskazań, preferowanym gatunkiem jest szczur. Należy zastosować powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy młodych, zdrowych zwierząt. Na początku badania różnica w wadze wykorzystywanych zwierząt nie powinna przekraczać ± 20 % odpowiedniej średniej wartości. W przypadku przeprowadzania testów podchroniczności doustnej jako wstęp do badań długoterminowych, ten sam gatunek i szczep powinny być wykorzystane w obu badaniach.

Liczba i płeć

Co najmniej 20 zwierząt (10 samic i 10 samców) powinno być poddanych ekspozycji każdej wielkości stężenia substancji. Samice powinny być nieciężarne i takie, które nie rodziły. Jeżeli planowane są zgony zwierząt, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt planowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badań. Ponadto grupa satelitarna w ilości 20 zwierząt (10 zwierząt każdej płci) może zostać poddana działaniu wysokiego stężenia przez okres 90 dni i obserwowana pod względem odwracalności, odporności lub opóźnionego pojawienia się toksycznych skutków, przez 28 dni po zakończeniu czynności badawczych.

Stężenia do celów ekspozycji

Wymagane są co najmniej trzy rodzaje stężenia, dla grupy kontrolnej i w grupy kontrolnej do oceny nośnika (odpowiadające stężeniu nośnika przy najwyższej wielkości dawki), w przypadku stosowania nośnika. Z wyjątkiem zastosowania substancji testowej, zwierzęta z grupy kontrolnej powinny być traktowane w identyczny sposób co podmioty z grupy badanej. Najwyższe stężenie powinno wywołać skutki toksyczności, ale żadnych lub kilka przypadków śmiertelności. W przypadku rozważenia ekspozycji człowieka, najniższa dawka powinna ją przekraczać. Najlepiej byłoby, gdyby średnie stężenie wywoływało minimalne dające się zaobserwować skutki toksyczności. W przypadku użycia więcej niż jednego średniego stężenia, stężenia powinny zostać rozszerzone w celu wywołania stopniowania skutków toksyczności. W grupach poddanych niskiemu i średniemu stężeniu oraz w grupach kontrolnych jakiekolwiek przypadki śmiertelności powinny być nieliczne, w celu umożliwienia dokonania miarodajnej oceny wyników badań.

Czas ekspozycji

Dzienny czas trwania ekspozycji powinien wynosić sześć godzin po zrównoważeniu stężeń w komorach. Inne długości czasu trwania ekspozycji mogą zostać zastosowane w celu spełnienia szczególnych wymagań.

Wyposażenie

Zwierzęta powinny być badane z użyciem sprzętu inhalacyjnego zaprojektowanego w celu podtrzymania dynamicznego przepływu powietrza przy co najmniej 12 wymianach powietrza na godzinę w celu zapewnienia odpowiedniej zawartości tlenu oraz równomiernie dystrybuowanego powietrza z zawartością substancji. W przypadku stosowania komory, jej projekt powinien zminimalizować tłoczenie się badanych zwierząt i zminimalizować, przez inhalację, ich narażenie na substancję testową. Ogólnie rzecz biorąc, w celu zapewnienia stabilności komory powietrznej, ogólna liczba (objętość) badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory badawczej. Wykorzystywane mogą być komory ustno-nosowe, obejmujące całą głowę lub całe ciało; pierwsze dwie komory minimalizują pobieranie substancji innymi drogami.

Okres obserwacji

Badane zwierzęta powinny być obserwowane codziennie w celu wykrycia objawów toksyczności podczas całego okresu badania oraz okresu regeneracji. Należy odnotować czas zgonu i czasu pojawienia się i zaniku objawów toksyczności.

Procedura

Zwierzęta poddane są działaniu substancji przez cały dzień, pięć do siedmiu dni w tygodniu, przez okres 90 dni. Zwierzęta jakiejkolwiek grupy satelitarnej przeznaczone do obserwacji uzupełniających powinny być trzymane przez dalsze 28 dni bez podawania dawek w celu stwierdzenia odwracalności lub odporności na skutki toksyczności. Wysokość temperatury, w jakiej przeprowadzane jest badanie należy utrzymywać na poziomie 22 ± 3 °C. Należy utrzymywać względną wilgotność między 30 % i 70 %, ale w niektórych przypadkach (np. badania aerozoli) stosowanie powyższego nie jest wymagane. Należy wstrzymać wydawanie pożywienia i wody w czasie ekspozycji na działanie substancji. Substancja testowa dawkowana jest zwierzętom najlepiej siedem dni w tygodniu przez okres 90 dni.

Konieczne jest wykorzystanie dynamicznego systemu inhalacji z odpowiednim analitycznym systemem kontroli stężenia. W celu ustalenia odpowiedniego stężenia zaleca się przeprowadzenie testu próbnego. Należy dostosować przepływ powietrza w celu zapewnienia jednolitych warunków w komorze. System powinien zapewnić jak najszybsze osiągnięcie stabilnych warunków działania czynnika.

Pomiary lub kontrole powinny obejmować:

a) tempo przepływu powietrza (stałe);

b) rzeczywiste stężenie substancji testowej mierzone w strefie oddychania. W czasie oddziaływania substancji stężenie nie powinno ulegać wahaniom wyższym niż ± 15 % średniej wartości. Jednakże w przypadku pyłów i aerozoli, niniejsza wielkość kontrolna może nie zostać osiągnięta i akceptuje się stosowanie szerszego zakresu. W czasie całego czasu trwania badań, dzienne stężenia powinny być utrzymywane na możliwie stałym poziomie. Rozwijając system wytwarzania, należy przeprowadzić analizę granulometryczną w celu ustalenia stabilności stężenia aerozoli. W czasie działania substancji należy przeprowadzać analizy tak często, jak będzie to konieczne celem ustalenia spójności dystrybucji granulometrycznej;

c) temperatura i wilgotność;

d) w czasie trwania działania substancji należy systematycznie odnotować uwagi; należy prowadzić indywidualne rejestry dla każdego zwierzęcia. Wszystkie zwierzęta powinny być codziennie obserwowane, a objawy toksyczności odnotowane, włączając czas ich rozpoczęcia, stopień oraz czas trwania. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować: zmiany zachodzące na ich skórze i futrze, zmiany oczu i błonie śluzowej, a także zmiany układu oddechowego, krążenia oraz autonomicznego i centralnego układu nerwowego, czynności somatomotorycznych oraz schematów zachowań. Powinny być dokonywane pomiary spożycia żywności oraz pomiary wagi ciała zwierząt raz w tygodniu. Regularne obserwacje zwierząt są konieczne w celu zapewnienia, że nie występują straty w zwierzętach w wyniku takich przypadków, jak kanibalizm, autoliza tkanek lub nieprawidłowe umieszczenie. Na końcu okresu ekspozycji wszystkie zwierzęta pozostałe przy życiu zostają poddane sekcji zwłok. Zwierzęta konające powinny być usuwane i poddawane sekcji zwłok po stwierdzeniu takiego faktu.

Wszystkie zwierzęta, włączając zwierzęta z grup kontrolnych, zwyczajowo poddawane są następującym badaniom:

a) badanie oftalmologiczne z wykorzystaniem oftalmoskopu lub podobnego sprzętu, powinny zostać wykonane przed poddaniem działaniu substancji testowej oraz zakończeniem badań, najlepiej na wszystkich zwierzętach, a co najmniej na zwierzętach z grupy najwyższej dawki i grupy kontrolnej. W przypadku wykrycia zmian w oczach, należy przebadać wszystkie zwierzęta;

b) hematologia, włączając hematokryt, stężenie hemoglobiny, badanie ilości krwinek czerwonych, całkowitej ilości krwinek białych i obraz białokrwinkowy, pomiar wskaźników krzepliwości krwi takich jak czas krzepnięcia, czas protrombinowy, czas tromboplastynowy, czy ilość płytek krwi powinny zostać zbadane na końcu okresu badania;

c) powinno zostać przeprowadzone określenie klinicznej biochemii krwi na końcu okresu badania. Obszarami uważanymi za właściwe dla wszystkich badań są: równowaga elektrolityczna, metabolizm węglowodanów, funkcje wątroby i nerek. Wybór szczególnych badań będzie uzależniony od obserwacji formy i działania substancji. Sugerowane ustalenia to: pomiar wapnia, fosforu, chlorku, sodu, potasu, stężenie glukozy na czczo (z okresem głodzenia stosownym do gatunku zwierzęcia), transaminaza pirogronianowo-glutaminowa surowicy ([1]), transaminaza szczawiowooctowoglutamylowa surowicy ([2]), dekarboksylazy ornityny, transpeptydaza gammaglutamylowa, mocznika azotu, albuminy, kreatyny krwi całkowitej bilirubiny oraz całkowitej surowicy białka. Inne ustalenia, które mogą być niezbędne do właściwej analizy toksykologicznej, obejmują analizy lipidów, hormonów, równowagi kwasowo-zasadowej, czynności metahemoglobiny i cholinoesteraza. Dodatkowa biochemia kliniczna może zostać zastosowana w miarę potrzeby w celu rozszerzenia badań w zakresie obserwowanych skutków;

d) analiza moczu nie jest wymagana jako badanie rutynowe, ale jedynie w przypadku spodziewanej lub zaobserwowanej toksyczności.

Jeżeli dane bazowe są niewystarczające, należy rozważyć określenie parametrów hematologicznych i biochemii klinicznej przed rozpoczęciem dawkowania.

Sekcja zwłok

Wszystkie zwierzęta powinny być poddane sekcji zwłok, która obejmuje badanie zewnętrznej powierzchni ciała, wszelkich otworów, jamy czaszkowej, klatki piersiowej i jamy brzusznej oraz ich zawartości. Wątroba, nerki, nadnercza oraz jądra powinny być zważone niezwłocznie po przeprowadzeniu sekcji w celu uniknięcia wyschnięcia. Poniższe organy i tkanki powinny być zachowane w odpowiednim pojemniku w celu ewentualnego przyszłego badania histopatologicznego: wszystkie zmiany patologiczne, płuca, które należy usunąć w stanie nienaruszonym, należy zważyć i poddać działaniu odpowiedniego utrwalacza celem zapewnienia utrzymania struktury płuc (przepłukiwanie odpowiednim utrwalaczem uważane jest za skuteczną procedurę), tkanki nosogardzieli, mózg – włączając części rdzenia/most, móżdżek i kora mózgowa, przysadka mózgowa, tarczyca/przytarczyca, tkanki grasicy, tchawica, płuca, serce, aorta, gruczoły ślinowe, wątroba, śledziona, nerki, nadnercza, trzustka, gruczoły płciowe, macica, (dodatkowe organy genitaliów), (skóra) woreczek żółciowy (jeżeli obecny), przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, pęcherz moczowy, przedstawiciel pachowych węzłów chłonnych, (żeńskie gruczoły malene), (umięśnienie uda), nerwy obwodowe, (oczy), mostek wraz ze szpikiem kostnym, (kość udowa, włączając powierzchnie stawowe) i (rdzeń kręgowy w trzech poziomach – szyjny, śródpiersiowy i lędźwiowy). Tkanki wymienione w nawiasach będą wymagały przebadania w przypadku powstania objawów toksyczności lub stanu organów, na które skierowane jest działanie substancji.

Badania histopatologiczne

a) Pełna histopatologia powinna zostać przeprowadzona na drogach oddechowych oraz na organach i tkankach zwierząt w grupie kontrolnej i grupie najwyższego dawkowania.

b) Wszelkie zmiany patologiczne powinny zostać zbadane.

c) Organy, na które skierowane jest działanie substancji, w grupach innego dawkowania powinny zostać zbadane.

d) Płuca zwierząt w grupach niskiego i średniego dawkowania powinny zostać poddane badaniu histopatologicznemu, ponieważ niniejsze badania dostarcza dogodnej oceny stanu zdrowia zwierząt. Przeprowadzanie dalszych badań histopatologicznych nie musi być wymagane jako rutynowe w odniesieniu do zwierząt w tych grupach, ale zawsze musi być przeprowadzane na organach, które wykazują dowody zmian patologicznych w grupie najwyższego dawkowania.

e) W przypadku wykorzystywania grupy satelitarnej, histopatologia powinna zostać przeprowadzona na tkankach i organach zidentyfikowanych jako wykazujące zmiany patologiczne w grupach poddanych badaniu.

([1]) Obecnie znane pod nazwą aminontransferaza alaninowa surowicy.
([2]) Obecnie znane pod nazwą aminotransferaza asparaginianowa surowicy.

2. **DANE**

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wskazującej liczbę zwierząt w każdej badanej grupie na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne, rodzaje amin oraz odsetek zwierząt wykazujących każdy z rodzajów zmian. Wyniki powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań zawiera, w miarę możliwości, następujące informacje:

— gatunek lub szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,

— warunki badania,

Opis urządzeń badawczych: włączając projekt, typ, wymiary, źródło powietrza, system wytwarzania cząstek stałych zawieszonych w gazie i aerozoli, metoda klimatyzowania powietrza, oczyszczanie powietrza z komory i metoda umieszczania zwierząt w komorze badawczej w razie jej stosowania. Należy opisać sprzęt do pomiaru temperatury, wilgotności, w miarę potrzeb, stabilność stężenia aerozoli lub wielkości cząsteczki.

Dane dotyczące badania: powinny zostać umieszczone w tabeli i przedstawione jako wartość średnia wraz z pomiarem zmiennej (np. odchylenie standardowe) i powinny zawierać:

a) wskaźnik przepływu powietrza przez sprzęt inhalacyjny;

b) temperatura i wilgotność powietrza;

c) nominalne stężenia (całkowita ilość substancji testowej wprowadzana do sprzętu inhalacyjnego, podzielona przez ilość powietrza);

d) charakter nośnika, jeżeli był użyty;

e) właściwe stężenia w badanej strefie oddechowej;

f) średnie wielkości cząsteczki (gdzie sytuacja tego wymaga),

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i stężenie,

— brak skutków,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia,

— opis skutków toksyczności lub innych (ze szczególnym uwzględnieniem wyników badań klinicznych),

— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,

— wyniki badań oftalmologicznych,

— zastosowane badania hematologiczne oraz wszystkie wyniki,

— zastosowane kliniczne badania biochemiczne oraz wszystkie wyniki (włączając wyniki wszelkich analiz moczu),

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,

— statystyczne ujęcie wyników, w odpowiednich przypadkach,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE DZIAŁANIA TERATOGENNEGO – GRYZONIE I INNE GATUNKI

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Substancja testowa podawana jest w dawkach stopniowanych lub stężeniach, przez co najmniej ten okres ciąży obejmujący organogenezę, kilku grupom ciężarnych zwierząt badanych, w danej grupie stosowany jest jeden rodzaj dawki. Bezpośrednio przed przewidywanym terminem porodu matka jest uśmiercana, macica zostaje usunięta, a jej zawartości poddane badaniu. Niniejsza metoda badawcza dotyczy toksyczności zarodka i płodu.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Zdrowe, młode, dorosłe, dziewicze samice w porównywalnym wieku i rozmiarach ciała są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych co najmniej przez okres pięciu dni przed rozpoczęciem testu i następnie kojarzone są z samcami o ustalonej płodności. Zainseminowane samice są dobierane losowo i przydzielane do grup badanych.

Krycie może być przeprowadzone w sposób naturalny lub przez sztuczne zainseminowanie. Substancja testowa jest podawana codziennie samicom bezpośrednio po ich zainseminowaniu, a jej podawanie kontynuowane jest przez okres organogenezy. Dzień przed porodem płody odbierane są przez histerektomię oraz poddawane są badaniom w celu wykrycia nieprawidłowości w ich wnętrznościach oraz budowie kostnej, włączając upośledzenie wzrostu, opóźniony proces kostnienia oraz krwotoki jelitowe.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Powszechnie wykorzystywane gatunki to szczur, mysz, chomik i królik. Gatunkami najchętniej wykorzystywanymi są szczur i królik. Należy zastosować powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy. Szczep nie powinien wykazywać niskiej płodności i powinien być scharakteryzowany pod względem reakcji na czynniki teratogenne. Zwierzęta powinny być umieszczane w osobnych klatkach.

Liczba i płeć

Co najmniej 20 zapłodnionych samic szczura, myszy lub chomika lub 12 zapłodnionych samic królika wymagane jest w celu poddania działania każdej wielkości dawki. Celem jest zapewnienie odpowiedniej ilości miotu i młodych dla umożliwienia oceny teratogenetycznego wpływu substancji testowej.

Poziomy dawek

Powinny zostać wykorzystane co najmniej trzy dawki i dawka kontrolna. Jeżeli substancja testowa jest podawana z nośnikiem, to badania należy przeprowadzić z uwzględnieniem grupy kontrolnej, której podawany jest wyłącznie nośnik. Jeżeli stosuje się nośnik, to powinny być znane jego właściwości toksykologiczne; nie powinien wykazywać właściwości teratogennych lub wpływać na reprodukcję. Z wyjątkiem stosowania

substancji testowej, zwierzęta grupy kontrolnej powinny być traktowane w identyczny sposób, co podmioty grupy badanej. Jeżeli dawka nie jest ograniczona fizyczno-chemicznymi lub biologicznymi właściwościami substancji, najwyższa wielkość dawki powinna wywoływać jawną toksyczność w okresie macierzyństwa, skutkującą nieznaczną utratą wagi ciała, ale wskaźnikiem zgonów matek nie większym niż 10 %. Niski poziom dawki nie powinien wywoływać dających się zaobserwować skutków przypisanych substancji testowej. Dawka(-i) średnia(-e) powinna być rozmieszczona geometrycznie między wysokim a niskim poziomem dawki.

Test graniczny

W przypadku substancji o niskiej toksyczności, jeżeli dawka wynosząca co najmniej 1000 mg/kilogram nie powoduje żadnych dowodów działania embriotoksycznego lub teratogennego, badania przy zastosowaniu innych poziomy dawek mogą być uznane za niepotrzebne.

Okres ekspozycji

Dzień 0 badania to dzień obserwacji fizycznej zapłodnienia i/lub nasienia (jeżeli wykonalne). Okres dawkowania powinien obejmować okres głównej organogenezy. Jako okres ten można przyjąć 6–15 dni dla szczurów i myszy, 6–14 dni dla chomika lub 6–18 dni dla królika. Jeżeli dzień 0 oparty jest na obserwacji krycia lub sztucznej inseminacji, wymienione okresy powinny zostać dostosowane przez dodanie jednego dnia. Ewentualnie okres dawkowania może być przedłużony o około jeden dzień przed spodziewanym terminem porodu.

Okres obserwacji

Gruntowne badanie kliniczne powinno zostać przeprowadzone co najmniej raz dziennie. Każdego dnia należy przeprowadzać dodatkowe obserwacje, podejmując odpowiednie działania w celu zminimalizowania strat w badanych zwierzętach.

Procedura

Substancja jest podawana doustnie za pomocą dozownika. Substancja testowa powinna być podawana o podobnej porze dnia.

Samice badanych zwierząt poddawane są działaniu substancji testowej codziennie przez odpowiedni okres badania. Dawka może być oparta na wadze samic odnotowanej na początku okresu jej podawania, lub, ewentualnie, ze względu na szybką utratę wagi ciała, która ma miejsce w okresie ciąży, zwierzęta mogą być ważone okresowo, a dawka oparta na określeniu aktualnej wagi ciała. Należy odnotować objawy toksyczności w chwili ich zaobserwowania, włączając czas ich pojawienia się, stopień oraz czas trwania. Samice wykazujące objawy poronienia lub przedwczesnego porodu powinny zostać uśmiercone i poddane gruntownemu badaniu makroskopowemu. Okres obserwacji po zakończeniu poddania działaniu substancji powinien trwać do około jednego dnia przed terminem porodu; celem jest objęcie badaniem większości okresu ciąży, jednakże unikając komplikacji interpretacji wyników, która może nastąpić po dokonaniu porodu w sposób naturalny. Obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować, ale nie wyłącznie, zmiany zachodzące na ich skórze i futrze, zmiany oczu i błony śluzowej, a także zmiany układu oddechowego, krążenia oraz autonomicznego i centralnego układu nerwowego, czynności somatomotorycznych oraz schematów zachowań. Powinny być przeprowadzane pomiary spożycia żywności oraz pomiary wagi ciała zwierząt raz w tygodniu. Zwierzęta powinny być ważone raz w tygodniu.

Sekcja zwłok

W chwili śmierci lub po zakończeniu badań matkę należy poddać makroskopowemu badaniu celem wykrycia jakichkolwiek strukturalnych nieprawidłowości lub zmian patologicznych, które mogły wpłynąć na ciążę. Niezwłocznie po zgonie zwierzęcia należy usunąć macicę i zbadać zawartość w celu stwierdzenia ilości zarodków lub płodów martwych i żywych. Zazwyczaj możliwe jest oszacowanie czasu zgonu *in utero* (macicznego) w przypadku gdy taki nastąpił. W przypadku szczurów i królików można ustalić ilość *ciałek żółtych*. Należy ustalić płeć płodów i zważyć poszczególne osobniki a pomiary wagi należy odnotować i ustalić średnią wagę płodu. Po usunięciu, każdy płód powinien zostać zbadany zewnętrznie. W odniesieniu do szczurów, myszy i chomików, należy przygotować i zbadać jedną trzecią lub połowę każdego miotu w celu wykrycia nieprawidłowości szkieletowych, a pozostała część każdego miotu powinna zostać przygotowana i przebadana w celu wykrycia nieprawidłowości w tkance miękkiej z wykorzystaniem właściwych metod. W odniesieniu do królików, każdy płód powinien zostać zbadany przez dokładne przeprowadzenie sekcji zwłok w celu wykrycia nieprawidłowości wewnętrznych, a następnie nieprawidłowości szkieletowych.

2. **DANE**

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli wykazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę i procent żywych płodów oraz płody z wszelkimi nieprawidłowościami tkanki miękkiej i kostnej oraz ich powiązania ze szczególnymi miotami. Wyniki należy oszacować właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,
— warunki badania,
— dawkowanie (włączając nośnik, jeżeli został użyty) oraz jego stężenie,
— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę,
— brak skutków,
— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia,
— opis skutków toksyczności lub innych,
— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,
— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,
— czas trwania ciąży oraz dane dotyczące miotu (włączając dane bazowe),
— dane dotyczące płodu (żywy/martwy, płeć, uszkodzenia tkanki miękkiej i kostnej),
— dane dotyczące miotu (żywy/martwy, płeć, uszkodzenia tkanki miękkiej i kostnej dla każdego miotu),
— statystyczne ujęcie wyników,
— analiza wyników,
— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

BADANIE TOKSYCZNOŚCI CHRONICZNEJ

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Substancja testowa podawana jest zwykle przez siedem dni w tygodniu, odpowiednią drogą, kilku grupom zwierząt badanych, jedna dawka dla danej grupy przez większą część długości ich życia. Podczas ekspozycji oraz po jej zakończeniu zwierzęta obserwowane są codziennie w celu wykrycia objawów toksyczności.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania, młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Gatunkiem preferowanym jest szczur. W oparciu o wyniki wcześniej przeprowadzonych badań, inne gatunki (gryzonie lub inne) mogą zostać wykorzystane. Należy zastosować powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy młodych, zdrowych zwierząt, a dawkowanie należy rozpocząć, jeżeli możliwe, bezpośrednio po zakończeniu ssania.

W początkowej fazie badań, różnice wagi ciała wykorzystywanych zwierząt nie powinny przekroczyć ± 20 % wartości średniej. W przypadku przeprowadzania badań podchronicznej toksyczności doustnej jako wstęp do długotrwałych badań, do obu rodzajów badań należy wykorzystać ten sam gatunek/rasę i szczep.

Liczba i płeć

W przypadku gryzoni co najmniej 40 zwierząt (20 samic i 20 samców) powinno być wykorzystanych do podania każdej z dawek i równolegle grupie kontrolnej. Samice powinny być niecięŻarne i takie, które nie rodziły. Jeżeli planowane jest uśmiercenie zwierząt, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt planowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badań.

W przypadku gatunków innych niż gryzonie akceptowana jest mniejsza liczba zwierząt, ale nie mniejsza niż cztery osobniki danej płci w danej grupie.

Poziomy dawek i częstotliwość ekspozycji

Należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek w uzupełnieniu do równoległej grupy kontrolnej. Najwyższa wielkość dawki powinna wywołać określone objawy toksyczności, nie powodując nadmiernej śmiertelności. Najniższa dawka nie powinna wywoływać żadnych objawów toksyczności.

Dawka(-i) pośrednia powinna zostać ustalona na średnim poziomie między najwyższą a najniższą dawką.

Przy wyborze poziomu dawek należy uwzględnić dane wcześniejszych testów toksyczności i badań.

Należy zastosować zwykłą, dzienną częstotliwość ekspozycji. Jeżeli substancja chemiczna podawana jest w wodzie pitnej lub domieszana jest do pożywienia, powinna być dostępna w sposób ciągły.

Kontrole

Należy wykorzystać równoległą grupę kontrolną, która pod każdym względem odpowiada grupom badanym, z wyjątkiem poddania jej ekspozycji na substancję testową.

W szczególnych okolicznościach, takich jak badania inhalacyjne z użyciem aerozoli lub podawanych doustnie środków emulgujących o niepoznanej dotychczas aktywności biologicznej konieczne jest dołączenie równoległej kontrolnej grupy negatywnej. Zwierzęta z kontrolnej grupy negatywnej są traktowane w ten sam sposób co grupa badana z wyjątkiem ekspozycji na substancję testową ani jakikolwiek nośnik.

Droga podawania substancji

Droga pokarmowa oraz oddechowa stanowią dwie główne drogi podawania substancji. Wybór drogi podawania substancji zależy od fizycznych i chemicznych właściwości substancji testowej i prawdopodobnych dróg ekspozycji człowieka.

Wybór drogi, jaką jest stosowanie substancji na skórze, przedstawia znaczne problemy natury praktycznej. Chroniczna toksyczność systemiczna wynikająca z absorpcji przez skórę może być normalnie wywnioskowana na podstawie wyników innego badania doustnego oraz na podstawie wiedzy z zakresu badań absorpcji przez skórę pochodzącej z wcześniejszych badań toksyczności.

Badania doustne

W przypadku wchłaniania substancji z przewodu żołądkowo-jelitowego, oraz jeżeli droga przyjmowania pokarmu stanowi drogę ekspozycji człowieka, pożądaną drogą podawania substancji jest droga pokarmowa, jeżeli nie istnieją przeciwwskazania.

Zwierzęta mogą otrzymywać substancję testową w pożywieniu, rozcieńczoną w wodzie pitnej lub podawaną w kapsułkach.

Najlepiej stosować codzienne dawkowanie przez siedem dni w tygodniu, ponieważ dawkowanie na zasadzie pięciu dni w tygodniu może powodować odwracalność lub cofnięcie toksyczności w okresie niepodawania dawki, przez co może wpłynąć na wyniki i ich późniejszą analizę. Jednakże głównie w oparciu o względy praktyczne, akceptowane jest dawkowanie na zasadzie dawkowania przez okres pięciu dni w tygodniu.

Badania inhalacyjne

Ponieważ badania inhalacyjne przedstawiają techniczne problemy o większej złożoności niż podawanie substancji innymi drogami, niniejszym podaje się bardziej szczegółowe wskazówki dotyczące tego sposobu podawania substancji. Należy również zauważyć, iż wewnątrztchawiczne wkraplanie może stanowić poważną alternatywę w szczególnych sytuacjach.

Długoterminowe ekspozycje są zazwyczaj wzorowane na przewidywanej ekspozycji człowieka na działanie substancji. Zwierzęta poddawane są sześciogodzinnej ekspozycji po wyrównaniu stężeń komory, przez pięć dni w tygodniu (ekspozycja nieregularna), istotne w związku z ewentualnym wpływem środowiska, 22–24 godzin poddania działaniu substancji dziennie przez siedem dni w tygodniu (ciągłe działanie), z godzinną przerwą na karmienie zwierząt w ciągu dnia o podobnej porze i konserwację komory. W obu przypadkach zwierzęta zazwyczaj poddane są działaniu stałych stężeń substancji testowej. Główna różnica między nieregularną a ciągłą ekspozycją polega na tym, że w okresie nieregularnej ekspozycji występuje przerwa 17–18 godzin, podczas której zwierzęta mogą się zregenerować w związku ze skutkami wywołanymi ekspozycją codziennej dawki, z jeszcze dłuższym okresem regeneracji w czasie przerwy weekendowej.

Wybór nieregularnego lub ciągłego dawkowania zależy od celów badań i symulacji sytuacji ekspozycji człowieka na działanie substancji. Jednakże należy wziąć pod uwagę niektóre trudności techniczne. Na przykład korzyści z ciągłej ekspozycji na symulowane warunki środowiska mogą być równoważone koniecznością pojenia oraz karmienia zwierząt podczas badania, oraz potrzebą wytworzenia bardziej skomplikowanych (i pewnych) aerozoli i oparów oraz technik kontroli.

Komory ekspozycyjne

Zwierzęta powinny być badane w komorach inhalacyjnych zaprojektowanych w celu podtrzymania dynamicznego przepływu powietrza, przy co najmniej 12 wymianach powietrza na godzinę dla zapewnienia odpowiedniej zawartości tlenu oraz równomiernej dystrybucji powietrza z zawartością substancji. Komory kontrolne i badawcze powinny być identyczne pod względem konstrukcji i projektu w celu zapewnienia porównywalnych warunków badania pod każdym względem, z wyjątkiem ekspozycji na substancję testową. Niewielkie ujemne ciśnienie wewnątrz komory jest na ogół utrzymywane w celu zapobieżenia wystąpieniu przecieku substancji testowej do otoczenia. Komory powinny zminimalizować tłoczenie się badanych zwierząt. Ogólnie, w celu zapewnienia stabilności komory powietrznej, ogólna liczba (objętość) badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory.

Pomiary lub kontrole powinny obejmować:

i) przepływ powietrza: tempo przepływu powietrza przez komorę powinno być stale kontrolowane;

ii) stężenie: w czasie oddziaływania substancji stężenie nie powinno ulegać wahaniom wyższym niż ± 15 % średniej wartości;

iii) temperatura i wilgotność: dla gryzoni należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 2 °C, i wilgotność w komorze 30–70 %, z wyjątkiem, gdy woda używana jest w celu zawieszenia substancji testowej w powietrzu wewnątrz komory. Oba wskaźniki należy stale kontrolować;

iv) pomiary wielkości cząsteczki: należy ustalić rozkład wielkości cząstek w atmosferze komory, włączając aerozole ciekłe i stałe. Cząsteczki aerozoli powinny posiadać wielkość możliwą do wchłonięcia przez badane zwierzęta. Próbki powietrza komory należy pobrać ze strefy oddechowej zwierząt. Próbka powietrza powinna być reprezentatywna dla warunków dystrybucji cząsteczek, działaniu, których poddane są zwierzęta i powinna obejmować, na zasadzie grawimetrycznej, całą ilość zawieszonego w powietrzu aerozolu nawet w przypadku gdy duża ilość aerozolu nie jest wchłaniana. Należy przeprowadzać częste analizy wielkości cząsteczki w czasie rozwijania systemu wytwarzania w celu zapewnienia stabilności aerozolu, a następnie tak często jak to konieczne podczas badań celem ustalenia odpowiedniego składu cząsteczek podlegających dystrybucji, których działaniu poddane są zwierzęta.

Czas trwania badań

Czas trwania podawania substancji powinien wynosić co najmniej 12 miesięcy.

Procedura

Obserwacje

Należy przeprowadzić dokładne badania kliniczne, co najmniej raz dziennie. Należy przeprowadzać dodatkowe obserwacje, każdego dnia podejmując odpowiednie działania w celu zminimalizowania strat w zwierzętach podczas badania, na przykład: sekcja zwłok lub schładzanie padłych zwierząt i odizolowywanie lub uśmiercanie słabych lub konających zwierząt. Należy przeprowadzić dokładne obserwacje w celu wykrycia początku powstawania skutków a także zminimalizowania strat w zwierzętach spowodowanych chorobą, autolizą lub kanibalizmem.

Objawy kliniczne, włączając zmiany neurologiczne i oczne, a także śmiertelność, powinny być odnotowane w odniesieniu do wszystkich zwierząt. Należy odnotować czas rozpoczęcia i kontynuację warunków toksyczności, włączając podejrzane nowotwory.

Należy odnotować wagę ciała indywidualnie dla każdego zwierzęcia raz w tygodniu podczas okresu pierwszych 13 tygodni okresu badania i następnie, co najmniej raz na cztery tygodnie. Przyjmowanie pokarmu należy ustalać co tydzień w pierwszym okresie 13 tygodni po rozpoczęciu badań, a następnie w około trzymiesięcznych odstępach, jeżeli stan zdrowia lub zmiany wagi ciała wymuszą stosowanie innej procedury.

Badanie hematologiczne

Badanie hematologiczne (np. badanie składu hemoglobiny, hematokrytu, całkowitej ilości krwinek czerwonych, całkowitej ilości krwinek białych, płytek krwi lub inne pomiary wskaźników krzepliwości krwi) należy przeprowadzić w ciągu trzech miesięcy, sześciu miesięcy, a następnie w sześciomiesięcznych odstępach i na zakończenie badań na próbkach krwi pobranych od gatunków innych niż gryzonie i od 10 szczurów/obojga płci. Jeżeli możliwe, próbki należy pobrać od tych samych szczurów w każdym przedziale. Ponadto należy pobrać próbki przed rozpoczęciem badań od gatunków innych niż gryzonie.

Jeżeli kliniczne obserwacje wskazują na pogorszenie stanu zdrowia zwierząt podczas badań, należy przeprowadzić obraz białokrwinkowy u zarażonych zwierząt.

Obraz białokrwinkowy należy przeprowadzić na próbkach pobranych od zwierząt z grupy najwyższego dawkowania i kontrolnych. Obrazy białokrwinkowe przeprowadzane są w grupach niższego dawkowania jedynie w przypadku wystąpienia dużej różnicy między grupą najwyższego dawkowania i kontrolnymi lub w przypadku wystąpienia patologicznych wyników badań.

Analiza moczu

Należy pobrać próbki moczu od gatunków innych niż gryzonie i od 10 szczurów/płeć wszystkich grup, jeżeli możliwe od tych samych szczurów w tych samych odstępach czasu, w celu wykonania analizy hematologicznej. Należy dokonać następujących ustaleń dla poszczególnych zwierząt lub dla połączonych próbek/płeć/grupa gryzoni:

— wygląd: rozmiary i waga poszczególnych zwierząt,

— białko, glukoza, ketony, krew utajona w kale (półilościowo),

— badanie mikroskopowe szlamu (półilościowo).

Chemia kliniczna

W sześciomiesięcznych odstępach i przy zakończeniu badania próbki krwi pobierane są od wszystkich gatunków innych niż gryzonie i od 10 szczurów/płeć wszystkich grup, w celu wykonania pomiarów chemii klinicznej, jeżeli możliwe od tych samych szczurów w każdym przedziale. Ponadto należy pobrać próbki przed rozpoczęciem badań od gatunków innych niż gryzonie. Z niniejszych próbek przygotowywana jest plazma krwi oraz należy dokonać następujących ustaleń:

— całkowite stężenie białka,

— stężenie albuminy,

— badanie funkcjonowania wątroby (takie jak działanie fosfatazy alkaicznej, działanie transaminazy pirogronianowo-glutaminowej [1]) i czynność transaminazy szczawiowooctowoglutamylowej [2])), transpeptydaza gammaglutamylowa, dekarboksylaza ornityny,

— metabolizm węglowodanów, taki jak stężenie glukozy we krwi,

— badanie funkcjonowania nerki, takie jak azotan mocznika krwi.

Sekcja zwłok

Należy przeprowadzić sekcję zwłok na wszystkich zwierzętach, włączając zwierzęta martwe w czasie trwania badania lub te, które zostały uśmiercone po stwierdzeniu stanu konania. Przed uśmierceniem zwierząt należy pobrać próbki krwi od wszystkich zwierząt w celu przeprowadzenia obrazów białokrwinkowych. Wszelkie widoczne zmiany patologiczne, przewidywane nowotwory lub zmiany o podłożu nowotworowym należy zachować. Należy podjąć próbę skorelowania wyników całości obserwacji z wynikami badań mikroskopowych.

Wszystkie organy i tkanki należy zachować w celu przeprowadzenia badania histopatologicznego. Zazwyczaj dotyczy ono następujących organów i tkanek: mózg [3] (rdzeń/most, móżdżek, kora mózgowa), przysadka mózgowa, tarczyca (włączając przytarczycę), grasica, płuca (włączając tchawicę), serce, aorta, gruczoły ślinowe, wątroba [3], śledziona, nerki [3], nadnercza [3], przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, macica, pęcherz moczowy, węzły chłonne, trzustka, gruczoły płciowe [3], dodatkowe organy genitaliów, żeńskie gruczoły malene, skóra, umięśnienie, nerwy obwodowe, rdzeń kręgowy (szyjny, śródpiersiowy, lędźwiowy), mostek wraz ze szpikiem kostnym, kość udowa (włączając staw) i oczy. Napełnienie płuc i pęcherza moczowego w utrwalaczu jest optymalnym sposobem zachowania niniejszych tkanek; napełnienie płuc w badaniach inhalacyjnych jest istotna dla właściwego badania histopatologicznego. W badaniach szczególnych, takich jak badania inhalacyjne, należy dokonać badania całości dróg oddechowych, włączając nos, gardło i krtań.

W przypadku przeprowadzania innych badań klinicznych, otrzymane informacje należy udostępnić przed badaniem mikroskopowym, ponieważ mogą dostarczyć ważnych wskazówek patologowi.

Histopatologia

Wszelkie widoczne zmiany, w szczególności nowotwory oraz inne zmiany patologiczne powstałe w jakimkolwiek organie, powinny zostać poddane badaniu mikroskopowemu. Ponadto zaleca się następujące procedury:

a) badanie mikroskopowe wszelkich zachowanych organów i tkanek wraz z pełnym opisem wszystkich wykrytych zmian:

   1. wszystkie zwierzęta martwe lub uśmiercone podczas badania;

   2. wszystkie grupy najwyższego dawkowania i kontrolne;

b) organy lub tkanki wykazujące nieprawidłowości spowodowane lub prawdopodobnie spowodowane działaniem substancji testowej są również badane w grupach niskiego dawkowania;

c) w przypadku gdy wyniki badań dostarczają dowodów na znaczne obniżenie normalnej długości życia zwierząt lub wywołują skutki, które mogą wpływać na reakcje toksyczności, należy zbadać następną, niższą wielkość dawki, jak opisano powyżej;

d) informacje dotyczące występowania zmian patologicznych zazwyczaj występujących w szczepach wykorzystywanych zwierząt, w tych samych warunkach laboratoryjnych, tj. kontrola danych bazowych, są niezbędne w celu poprawnego oszacowania znaczenia obserwowanych zmian u badanych zwierząt.

([1]) Obecnie znane pod nazwą aminontransferaza alaninowa surowicy.
([2]) Obecnie znane pod nazwą aminotransferaza asparaginianowa surowicy.
([3]) Organy te, pochodzące od dziesięciu zwierząt danej płci i grupy odnośnie do gryzoni i innych gatunków, plus tarczyca (z przytarczycami) odnośnie do gatunków innych niż gryzonie, powinny zostać zważone.

2. **DANE**

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wykazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących zmiany patologiczne oraz procent zwierząt wykazujących każdy z rodzajów zmian. Wyniki powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań zawiera, w miarę możliwości, następujące informacje:

— gatunek lub szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,

— warunki badania:

Opis urządzeń badawczych:

włączając projekt, typ, wymiary, źródło powietrza, system wytwarzania cząstek stałych zawieszonych w gazie i aerozoli, metoda klimatyzowania powietrza, oczyszczanie powietrza z komory i metoda umieszczania zwierząt w komorze badawczej w razie jej stosowania. Należy opisać sprzęt do pomiaru temperatury, wilgotności, w miarę potrzeb, stabilność stężenia aerozoli lub wielkości cząsteczki.

Dane dotyczące badania:

powinny zostać umieszczone w tabeli i przedstawione jako wartość średnia wraz z pomiarem zmiennej (np. odchylenie standardowe) i powinny zawierać:

a) wskaźnik przepływu powietrza przez sprzęt inhalacyjny;

b) temperatura i wilgotność powietrza;

c) nominalne stężenia (całkowita ilość substancji testowej wprowadzana do sprzętu inhalacyjny podzielona przez ilość powietrza);

d) charakter nośnika, jeżeli był użyty;

e) właściwe stężenia w badanej strefie oddechowej;

f) średnie wielkości cząsteczki (gdzie sytuacja tego wymaga),

— poziomy dawek (charakter nośnika, jeżeli był użyty) i stężenia,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę,

— brak skutków,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia,

— opis skutków toksyczności lub innych,

— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,

— wyniki badań oftalmologicznych,

— zastosowane badania hematologiczne oraz wszystkie wyniki,

— zastosowane kliniczne badania biochemiczne oraz wszystkie wyniki (włączając wyniki wszelkich analiz moczu),

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,

— statystyczne ujęcie wyników, w odpowiednich przypadkach,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne”, część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne”, część B.

BADANIE RAKOTWÓRCZOŚCI

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Substancja testowa zwykle podawana jest siedem dni w tygodniu, odpowiednią drogą, kilku grupom zwierząt badanych, jedna dawka dla danej grupy przez większą część długości ich życia. W okresie podawania dawki testowej oraz po zakończeniu jej stosowania, zwierzęta obserwowane są codziennie celem wykrycia objawów toksyczności, w szczególności po względem rozwoju nowotworów.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych.

Zwierzęta badane

W oparciu o wyniki wcześniej przeprowadzonych badań, inne gatunki (gryzonie lub inne) mogą zostać wykorzystane. Należy zastosować powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy młodych, zdrowych zwierząt, a dawkowanie należy rozpocząć, jeżeli możliwe, bezpośrednio po zakończeniu ssania.

W początkowej fazie badań różnice wagi ciała wykorzystywanych zwierząt nie powinny przekroczyć ± 20 % wartości średniej. W przypadku przeprowadzania badań synchronicznej toksyczności drogą pokarmową jako wstęp do długotrwałych badań, do obu rodzajów badań należy wykorzystać ten sam gatunek/rasę i szczep.

Liczba i płeć

W przypadku gryzoni, co najmniej 100 zwierząt (50 samic i 50 samców) powinno być wykorzystanych do podania każdej z dawek i tyle samo w grupie kontrolnej. Samice powinny być nieciężarne i takie, które nie rodziły. Jeżeli planowane jest uśmiercenie zwierząt, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt planowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badań.

Poziomy dawek i częstotliwość ekspozycji

Należy zastosować, co najmniej trzy poziomy dawek w uzupełnieniu do równoległej grupy kontrolnej. Najwyższy poziom dawki powinien wywołać objawy minimalnej toksyczności, takie jak nieznaczny spadek wagi ciała (mniej niż 10 %), nie wywołując znacznych zmian w normalnej długości życia zwierząt spowodowanej innymi skutkami niż wpływ nowotworów.

Najniższy poziom dawki nie powinien zakłócać normalnego wzrostu, rozwoju i długości życia zwierząt lub powodować jakiekolwiek objawy toksyczności. Ogółem, dawka ta nie powinna być niższa niż 10 % najwyższego poziomu dawki.

Dawka(-ki) pośrednia powinna zostać ustalona na średnim poziomie między najwyższą i najniższą dawką.

Przy wyborze poziomów dawek należy uwzględnić dane wcześniejszych testów toksyczności i badań.

Należy zastosować zwykłą, dzienną częstotliwość ekspozycji. Jeżeli substancja chemiczna podawana jest w wodzie pitnej lub wmieszana jest do pożywienia, powinna być dostępna w sposób ciągły.

Kontrole

Należy wykorzystać równoległą grupę kontrolną, która pod każdym względem odpowiada grupom badanym, z wyjątkiem ekspozycji na substancję testową.

W szczególnych przypadkach, takich jak badania inhalacyjne z użyciem aerozoli lub podawanych doustnie środków emulgujących o niepoznanej dotychczas aktywności biologicznej, konieczne jest dołączenie grupy kontrolnej. Zwierzęta z kontrolnej grupy negatywnej nie są poddawane ani działaniu substancji testowej ani jakiegokolwiek nośnika.

Droga podawania substancji

Droga pokarmowa, skórna oraz oddechowa stanowią trzy główne drogi podawania substancji. Wybór drogi podawania substancji zależy od fizycznych i chemicznych właściwości substancji testowej i prawdopodobnych dróg ekspozycji człowieka.

Badania doustne

W przypadku wchłaniania substancji z przewodu żołądkowo-jelitowego, oraz jeżeli droga przyjmowania pokarmu stanowi drogę ekspozycji człowieka, pożądaną drogą podawania substancji jest droga pokarmowa, jeżeli nie istnieją przeciwwskazania. Zwierzęta mogą otrzymywać substancję testową w pożywieniu, rozcieńczoną w wodzie pitnej lub podawaną w kapsułkach.

Najlepiej stosować codzienne dawkowanie przez siedem dni w tygodniu ponieważ dawkowanie na zasadzie pięciu dni w tygodniu może powodować regenerację lub cofnięcie toksyczności w okresie nie podawania dawki, przez co może wpłynąć na wyniki i ich późniejszą ocenę. Jednakże głównie w oparciu o względy praktyczne, akceptowane jest dawkowanie zasadniczo przez okres pięciu dni w tygodniu.

Badania naskórne

Można wybrać drogę działania substancji testowej przez naniesienie na skórę w celu dokonania symulacji głównej drogi ekspozycji człowieka oraz jako modelowy system wywoływania uszkodzeń skóry.

Badania inhalacyjne

Ponieważ badania inhalacyjne przedstawiają techniczne problemy bardziej złożone, niż w przypadku podawania substancji innymi drogami, niniejszym podaje się bardziej szczegółowe wskazówki dotyczące tego sposobu podawania substancji. Należy również zauważyć, że wewnątrztchawiczne wkraplanie może stanowić poważną alternatywę w szczególnych przypadkach.

Długoterminowa ekspozycja jest zazwyczaj wzorowana na przewidywanej ekspozycji ludzi na substancję. Zwierzęta poddawane są sześciogodzinnej ekspozycji po wyrównaniu stężeń w komorze, przez pięć dni w tygodniu (ekspozycja nieregularna), w związku z ewentualnym wpływem środowiskowym, 22 do 24 godzin poddania działaniu substancji dziennie przez siedem dni w tygodniu (ekspozycja ciągła), z godzinną przerwą na karmienie zwierząt w ciągu dnia o podobnej porze i konserwację komory. W obu przypadkach zwierzęta zazwyczaj poddane są działaniu stałych stężeń substancji testowej.

Główna różnica między ekspozycją nieregularną a ciągłą polega na tym, że w okresie nieregularnej ekspozycji występuje przerwa od 17 do 18 godzin, podczas której zwierzęta mogą się zregenerować w związku ze skutkami wywołanymi poddaniem działaniu codziennej dawki, z jeszcze dłuższym okresem regeneracji w czasie przerwy weekendowej.

Wybór nieregularnej lub ciągłej ekspozycji zależy od celów badań i symulacji sytuacji ekspozycji człowieka na substancję. Jednakże należy wziąć pod uwagę niektóre trudności techniczne. Na przykład korzyści z ekspozycji ciągłej na symulowane warunki środowiska mogą być równoważone koniecznością pojenia oraz karmienia zwierząt podczas badania, oraz potrzebą wytworzenia bardziej skomplikowanych (i pewnych) aerozoli i oparów oraz technik kontroli.

Komory ekspozycyjne

Zwierzęta powinny być poddane badaniu w komorach inhalacyjnych zaprojektowanych w celu podtrzymania dynamicznego przepływu powietrza przy co najmniej 12 wymianach powietrza na godzinę w celu zapewnienia odpowiedniej zawartości tlenu oraz równomiernej dystrybucji powietrza z zawartością substancji. Komory kontrolne i ekspozycyjne powinny być identyczne pod względem konstrukcji i projektu w celu zapewnienia porównywalnych warunków badania pod każdym względem z wyjątkiem poddania działaniu substancji testowej. Niewielkie ujemne ciśnienie wewnątrz komory jest na ogół utrzymywane w celu zapobieżenia wystąpienia przecieku substancji testowej do otoczenia. Komory powinny zminimalizować tłoczenie się badanych zwierząt. Ogólnie rzecz biorąc, w celu zapewnienia stabilności komory powietrznej ogólna liczba (objętość) badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory badawczej.

Pomiary lub kontrole powinny obejmować:

i) przepływ powietrza: tempo przepływu powietrza przez komorę powinno być stale kontrolowane;

ii) stężenie: w czasie dziennego oddziaływania substancji testowej, stężenie nie powinno ulegać wahaniom wyższym niż ± 15 % średniej wartości. Przez cały czas trwania badań codzienne stężenia powinny być utrzymywane na możliwie stałym poziomie;

iii) temperatura i wilgotność: dla gryzoni należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 2 °C, i wilgotność w komorze 30–70 %, z wyjątkiem gdy używana jest woda w celu zawieszenia substancji testowej w powietrzu wewnątrz komory. Oba wskaźniki należy stale kontrolować;

iv) pomiary wielkości cząsteczki: należy ustalić rozkład wielkości cząstek w atmosferze komory włączając aerozole ciekłe i stałe. Cząsteczki aerozoli powinny posiadać wielkość możliwą do wchłonięcia przez badane zwierzęta. Próbki powietrza komory powinny zostać przeniesione do strefy oddychania zwierząt. Próbka powietrza powinna być reprezentatywna dla warunków dystrybucji cząsteczek, działaniu, których poddane są zwierzęta i powinna obejmować, na zasadzie grawimetrycznej, całą ilość zawieszonego w powietrzu aerozolu nawet w przypadku gdy duża ilość aerozolu nie jest wchłaniana. Należy przeprowadzać częste analizy wielkość cząsteczki w czasie rozwijania systemu wytwarzania w celu zapewnienia stabilności aerozolu, a następnie tak często jak to konieczne podczas badań celem ustalenia odpowiedniego składu cząsteczek podlegających dystrybucji, których działaniu poddane są zwierzęta.

Czas trwania badań

Czas trwania badań rakotwórczości obejmuje większą część normalnej długości życia badanych zwierząt. Zakończenie testu powinno nastąpić w 18 miesiącu dla myszy i chomików oraz w 24 miesiącu dla szczurów; jednakże dla niektórych szczepów zwierząt o większej długowieczności i/lub współczynniku samorzutnej rakotwórczości, zakończenie badań powinno nastąpić w 24 miesiącu dla myszy i chomików oraz w 30 miesiącu dla szczurów. Ewentualnie, zakończenie takich przedłużonych badań jest do przyjęcia, w przypadku gdy liczba osobników, które przetrwały w grupie najniższej wielkości dawki lub grupie kontrolnej, osiągnęła 25 %. W przypadku zakończenia badania, które wykazało widoczną różnicę reakcji ze względu na płeć, każdą płeć należy uwzględnić oddzielnie. W przypadku przedwczesnego zgonu jedynie osobników z grupy najwyższego dawkowania z przyczyn oczywistej toksyczności, nie powoduje to zakończenia badań pod warunkiem, iż objawy toksyczności nie powodują problemów w innych grupach. W odniesieniu do negatywnych, ale akceptowalnych wyników badania, dopuszcza się stratę nie więcej niż 10 % osobników danej grupy z powodu autolizy, kanibalizmu lub problemów z zarządzaniem, a liczba osobników wszystkich grup, które przetrwały badanie jest nie mniejsza niż 50 % na 18 miesięcy dla myszy i chomików i 24 miesiące dla szczurów.

Procedura

Obserwacje

Codzienne obserwacje zwierząt w klatkach powinny obejmować zmiany zachodzące na ich skórze i futrze, zmiany oczu i błony śluzowej, a także zmiany układu oddechowego, krążenia oraz autonomicznego i centralnego układu nerwowego, czynności somatomotorycznych oraz schematów zachowań.

Regularne obserwacje zwierząt są konieczne w celu zapewnienia, o ile to możliwe, że nie występują straty w zwierzętach w wyniku takich przypadków, jak kanibalizm, autoliza tkanek lub nieprawidłowe umieszczenie. Zwierzęta konające powinny być usuwane i poddawane sekcji zwłok po stwierdzeniu takiego faktu.

Należy odnotować objawy kliniczne oraz śmiertelność wszystkich zwierząt. Należy zwrócić specjalną uwagę na rozwój nowotworów: należy odnotować czas rozpoczęcia, umieszczenie, wymiary, wygląd oraz dalszy rozwój każdego bardzo widocznego lub ewidentnego nowotworu.

Należy dokonać cotygodniowych pomiarów spożycia pokarmu (oraz spożycia wody, w przypadku gdy substancja testowa podawana jest w wodzie pitnej) w okresie pierwszych 13 tygodni po rozpoczęciu badań i następnie w odstępach trzymiesięcznych, chyba że stan zdrowia lub zmiany wagi ciała spowodują inną procedurę.

Należy odnotować wagę ciała indywidualnie dla każdego zwierzęcia raz w tygodniu podczas okresu pierwszych 13 tygodni okresu badania i następnie co najmniej raz na cztery tygodnie.

Badania kliniczne

Hematologia

W przypadku gdy obserwacje wskazują na pogorszenie się stanu zdrowia zwierząt podczas badań, należy przeprowadzić obraz białokrwinkowy u takich zwierząt.

W 12 miesiącu badań, 18 miesiącu i przed uśmierceniem zwierząt należy pobrać wymaz krwi badanych zwierząt. Należy przeprowadzać obraz białokrwinkowy na próbkach pobranych od zwierząt z grupy najwyższego dawkowania i kontrolnych. Jeżeli te dane, w szczególności dane otrzymane przed uśmierceniem zwierząt, lub badania pochodzące z badania patologicznego wskazują na taką potrzebę, należy również przeprowadzić obrazy białokrwinkowe na kolejnej grupie (grupach) niższego dawkowania.

Sekcja zwłok

Należy przeprowadzić sekcję zwłok na wszystkich zwierzętach, włączając zwierzęta martwe w czasie trwania badania, lub te, które zostały uśmiercone po stwierdzeniu stanu konania. Wszelkie widoczne nowotwory lub zmiany patologiczne, lub spodziewane zmiany o podłożu nowotworowym należy zachować.

Następujące organy i tkanki należy przechować w odpowiednim środku w celu przeprowadzenia ewentualnych przyszłych badań histopatologicznych. Zazwyczaj dotyczy ono następujących organów i tkanek: mózg (włączając części rdzenia/mostu, móżdżek, kora mózgowa), przysadka mózgowa, tarczyca/przytarczyca, wszelkie tkanki grasicy, tchawica i płuca, serce, aorta, gruczoły ślinowe, wątroba, śledziona, nerki, nadnercza, trzustka, gruczoły płciowe, macica, dodatkowe organy genitaliów, skóra, przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, macica, pęcherz moczowy, przedstawiciel węzłów chłonnych, żeńskie gruczoły malene, umięśnienie uda, nerwy obwodowe, mostek wraz ze szpikiem kostnym, kość udowa (włączając staw), rdzeń kręgowy w trzech poziomach (szyjny, śródpiersiowy, lędźwiowy) i oczy.

Napełnienie płuc i pęcherza moczowego w utrwalaczu jest optymalnym sposobem zachowania niniejszych tkanek; napełnienie płuc w badaniach inhalacyjnych jest istotne dla właściwego badania histopatologicznego. W badaniach inhalacyjnych, należy zachować całość dróg oddechowych, włączając jamę nosową, gardło i krtań.

Histopatologia

a) Pełna histopatologia powinna zostać przeprowadzona na organach i tkankach wszystkich padłych lub uśmierconych zwierząt w trakcie badania i wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i grup najwyższego dawkowania.

b) Wszelkie bardzo widoczne nowotwory lub zmiany patologiczne o przypuszczalnym pochodzeniu nowotworowym należy zbadać mikroskopowo we wszystkich grupach.

c) W przypadku istotnej różnicy w częstotliwości występowania zmian nowotworowych w grupach najwyższego dawkowania i w grupach kontrolnych, należy przeprowadzić badania histopatologiczne na takim szczególnym organie i tkance w innych grupach badanych.

d) Jeżeli ilość zwierząt pozostałych przy życiu w grupie najwyższego dawkowania jest znacznie niższa niż w grupie kontrolnej, wówczas należy przeprowadzić pełne badanie następnej grupy niższego dawkowania.

e) W przypadku istnienia dowodów wywoływania toksyczności lub innych skutków, które mogą wpływać na reakcję nowotworową w grupie najwyższego dawkowania, należy przeprowadzić pełne badanie następnej grupy niższego dawkowania.

2. DANE

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wskazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących nowotwory wykryte podczas badania, czas wykrycia oraz liczbę zwierząt, u których wykryto nowotwory po uśmierceniu. Wyniki powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— gatunek lub szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,

— warunki badania:

Opis urządzeń ekspozycyjnych:

włączając projekt, typ, wymiary, źródło powietrza, system wytwarzania cząstek stałych zawieszonych w gazie i aerozoli, metoda klimatyzowania powietrza, oczyszczanie powietrza z komory i metoda umieszczania zwierząt w komorze badawczej w razie jej stosowania. Należy opisać sprzęt do pomiaru temperatury, wilgotności, w miarę potrzeb, stabilność stężenia aerozoli lub wielkości cząsteczki.

Dane dotyczące badania:

powinny zostać umieszczone w tabeli i przedstawione jako wartość średnia wraz z pomiarem zmiennej (np. odchylenie standardowe) i powinny zawierać:

a) wskaźnik przepływu powietrza przez sprzęt inhalacyjny;

b) temperatura i wilgotność powietrza;

c) nominalne stężenia (całkowita ilość substancji testowej wprowadzana do sprzętu inhalacyjnego podzielona przez ilość powietrza);

d) charakter nośnika, jeżeli był użyty;

e) właściwe stężenia w badanej strefie oddechowej;

f) średnie wielkości cząsteczki (gdzie sytuacja tego wymaga),

— poziomy dawek (charakter nośnika, jeżeli był użyty) i stężenia,

— dane dotyczące częstotliwości występowania nowotworu w odniesieniu do płci, dawki i rodzaju nowotworu,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność z względu na płeć i dawkę,

— opis skutków toksyczności lub innych,

— okres obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,

— zastosowane testy hematologiczne i wszystkie ich wyniki,

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,

— statystyczne ujęcie wyników wraz z opisem stosowanych metod,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

POŁĄCZONE BADANIE TOKSYCZNOŚCI CHRONICZNEJ/RAKOTWÓRCZOŚCI

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Celem połączonych badań toksyczności chronicznej/rakotwórczości jest ustalenie chronicznych i rakotwórczych skutków oddziaływania substancji na gatunki ssaków po przedłużonej ekspozycji.

W tym celu badanie rakotwórczości uzupełnione jest o co najmniej jedną satelitarną grupę badaną i satelitarną grupę kontrolną. Wielkość dawki stosowana w satelitarnej grupie najwyższego dawkowania może być wyższa niż dawka stosowana w grupie najwyższego dawkowania w badaniu rakotwórczości. W przypadku zwierząt poddanych badaniu rakotwórczości badana jest ogólna reakcja toksyczności, a także rakotwórczości. W przypadku zwierząt z badanej grupy satelitarnej, badana jest ogólna reakcja toksyczności.

Substancja testowa podawana jest zwykle siedem dni w tygodniu, odpowiednią drogą, kilku grupom zwierząt badanych, jedna dawka dla danej grupy przez większą część ich życia. Podczas ekspozycji na substancję testową oraz po jej zakończeniu, zwierzęta obserwowane są codziennie celem wykrycia objawów toksyczności oraz rozwoju nowotworów.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania, przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania, młode zdrowe zwierzęta są dobierane losowo i przydzielane do grup badanych i kontrolnych.

Zwierzęta badane

Gatunkiem pożądanym jest szczur. W oparciu o wyniki wcześniej przeprowadzonych badań, inne gatunki (gryzonie lub inne) mogą zostać wykorzystane. Należy zastosować powszechnie wykorzystywane laboratoryjne szczepy młodych, zdrowych zwierząt, a dawkowanie należy rozpocząć, jeżeli możliwe, bezpośrednio po zakończeniu ssania.

W początkowej fazie badań różnice wagi ciała wykorzystywanych zwierząt nie powinny przekroczyć ± 20 % wartości średniej. W przypadku przeprowadzania testów podchroniczności doustnej jako wstęp do długotrwałych badań, do obu rodzajów badań należy wykorzystać ten sam gatunek i rasę/szczep.

Liczba i płeć

W przypadku gryzoni, do podania każdej z dawek powinno być wykorzystanych, co najmniej 100 zwierząt (50 samic i 50 samców) i tyle samo w grupie kontrolnej. Samice powinny być niecięŻarne i takie, które nie rodziły. Jeżeli planowane jest uśmiercenie zwierząt, ich liczba powinna zostać powiększona o liczbę zwierząt planowanych do uśmiercenia przed zakończeniem badań.

Satelitarna grupa doświadczalna (grupy) badana w celu oszacowania patologii innych niż nowotwory powinna zawierać 20 zwierząt każdej płci, podczas gdy satelitarna grupa doświadczalna powinna zawierać 10 zwierząt każdej płci.

Poziomy dawek i częstotliwość ekspozycji

Do celów badania rakotwórczości należy zastosować co najmniej trzy poziomy dawek w uzupełnieniu do równoległej grupy kontrolnej. Najwyższy poziom dawki powinien wywołać objawy minimalnej toksyczności, takie jak nieznaczny spadek wagi ciała (mniej niż 10 %), nie wywołując znacznych zmian w normalnej długości życia zwierząt spowodowanej innymi skutkami niż wpływ nowotworów.

Najniższy poziom dawki nie powinien zakłócać normalnego wzrostu, rozwoju i długości życia zwierząt lub powodować jakiekolwiek objawów toksyczności. Ogółem, dawka ta nie powinna być niższa niż 10 % najwyższego poziomu dawki.

Dawka(-ki) pośrednia powinna zostać ustalona na średnim poziomie między najwyższą i najniższą dawką.

Przy wyborze poziomów dawek należy uwzględnić dane wcześniejszych testów toksyczności i badań.

Do celów badania toksyczności chronicznej należy włączyć dodatkowe grupy doświadczalne i równoległą kontrolną grupę satelitarną. Najwyższa wielkość dawki dla satelitarnych zwierząt badanych powinna wywołać określone objawy toksyczności.

Należy zastosować zwykłą, dzienną częstotliwość ekspozycji. Jeżeli substancja chemiczna podawana jest w wodzie pitnej lub wmieszana jest do pożywienia, powinna być dostępna w sposób ciągły.

Kontrole

Należy wykorzystać równoległą grupę kontrolną, która pod każdym względem odpowiada grupom badanym, z wyjątkiem ekspozycji na substancję testową.

W szczególnych okolicznościach, takich jak badania inhalacyjne obejmujące aerozole lub wykorzystujące emulgator niescharakteryzowanej aktywności biologicznej w badaniach drogą pokarmową, należy wykorzystać dodatkową grupę kontrolną, bez ekspozycji na nośnik.

Droga podawania substancji

Droga pokarmowa, skóra oraz droga oddechowa stanowią trzy główne drogi podawania substancji. Wybór drogi podawania substancji zależy od fizycznych i chemicznych właściwości substancji testowej i prawdopodobnych dróg ekspozycji człowieka

Badania doustne

W przypadku wchłaniania substancji z przewodu żołądkowo-jelitowego, oraz jeżeli droga pokarmowa stanowi drogę ekspozycji człowieka, preferowaną drogą podawania substancji jest droga pokarmowa, jeżeli nie istnieją przeciwwskazania. Zwierzęta mogą otrzymywać substancję testową w pożywieniu, rozcieńczoną w wodzie pitnej lub podawaną w kapsułkach. Najlepiej stosować codzienne dawkowanie przez siedem dni w tygodniu, ponieważ dawkowanie na zasadzie pięciu dni w tygodniu może powodować regenerację lub cofnięcie toksyczności w okresie nie podawania dawki, co może wpłynąć na wyniki i ich późniejszą analizę. Jednakże głównie w oparciu o względy praktyczne, akceptowane jest dawkowanie na zasadzie dawkowania przez okres pięciu dni w tygodniu.

Badania naskórne

Można wybrać drogę ekspozycji przez naniesienie na skórę w celu dokonania symulacji głównej drogi ekspozycji człowieka oraz jako modelowy system wywoływania uszkodzeń skóry.

Badania inhalacyjne

Ponieważ badania inhalacyjne przedstawiają problemy techniczne o większej złożoności niż podawanie substancji innymi drogami, niniejszym podaje się bardziej szczegółowe wskazówki dotyczące tego sposobu podawania substancji. Należy również zauważyć, iż wewnątrztchawiczne wkraplanie może stanowić poważną alternatywę w szczególnych sytuacjach.

Długoterminowe ekspozycje są zazwyczaj wzorowane na przewidywanej ekspozycji człowieka. Zwierzęta poddawane są sześciogodzinnej ekspozycji po wyrównaniu stężeń komory, przez pięć dni w tygodniu (ekspozycja nieregularna), istotne w związku z ewentualnym wpływem środowiskowym, 22–24 godzin poddania działaniu substancji dziennie przez siedem dni w tygodniu (ciągłe działanie), z godzinną przerwą na karmienie zwierząt w ciągu dnia o podobnej porze i konserwację komory. W obu przypadkach zwierzęta zazwyczaj poddane są działaniu stałych stężeń substancji testowej. Główna różnica między ekspozycją nieregularną i ciągłą polega na tym, że w okresie nieregularnej ekspozycji występuje przerwa 17–18 godzin, podczas której zwierzęta mogą się zregenerować w związku ze skutkami wywołanymi poddaniu działaniu codziennej dawki, z jeszcze dłuższym okresem regeneracji w czasie przerwy weekendowej.

Wybór ekspozycji nieregularnej lub ciągłej zależy od celów badań i symulacji sytuacji ekspozycji człowieka. Jednakże należy wziąć pod uwagę niektóre trudności techniczne. Na przykład, korzyści z ekspozycji ciągłej na symulowane warunki środowiska mogą być równoważone koniecznością pojenia oraz karmienia zwierząt podczas badania, oraz potrzebą zastosowania bardziej skomplikowanych (i pewnych) aerozoli i oparów oraz technik kontroli.

Komory ekspozycyjne

Zwierzęta powinny być poddane badaniu w komorach inhalacyjnych zaprojektowanych w celu podtrzymania dynamicznego przepływu powietrza, przy co najmniej 12 wymianach powietrza na godzinę w celu zapewnienia odpowiedniej zawartości tlenu oraz równomiernej dystrybucji powietrza z zawartością substancji. Komory kontrolne i ekspozycyjne powinny być identyczne pod względem konstrukcji i projektu w celu zapewnienia porównywalnych warunków badania pod każdym względem z wyjątkiem poddania działaniu substancji testowej. Niewielkie ujemne ciśnienie wewnątrz komory jest na ogół utrzymywane w celu zapobieżenia wystąpienia przecieku substancji testowej do otoczenia. Komory powinny zminimalizować tłoczenie się badanych zwierząt. Ogólnie rzecz biorąc, w celu zapewnienia stabilności komory powietrznej, ogólna liczba (objętość) badanych zwierząt nie powinna przekraczać 5 % objętości komory badawczej.

Pomiary lub kontrole powinny obejmować:

i) przepływ powietrza: tempo przepływu powietrza przez komorę powinno być stale kontrolowane;

ii) stężenie: w czasie dziennej ekspozycji na substancję testową, stężenie nie powinno ulegać wahaniom wyższym niż ± 15 % średniej wartości. Podczas całego okresu trwania badań, codzienne stężenia powinny być utrzymywane na możliwie stałym poziomie.

iii) temperatura i wilgotność: dla gryzoni należy utrzymywać temperaturę na poziomie 22 ± 2 °C, i wilgotność w komorze od 30 do 70 %, z wyjątkiem, gdy używana jest woda w celu zawieszenia substancji testowej w powietrzu wewnątrz komory. Oba wskaźniki należy stale kontrolować;

iv) pomiary wielkości cząsteczki: należy ustalić rozkład wielkości cząstek w atmosferze komory włączając aerozole ciekłe i stałe. Cząsteczki aerozoli powinny posiadać wielkość możliwą do wchłonięcia przez badane zwierzęta. Próbki powietrza komory powinny zostać przeniesione do strefy oddychania zwierząt. Próbka powietrza powinna być reprezentatywna dla cząsteczek podlegających dystrybucji, działaniu, których poddane są zwierzęta i powinna obejmować, na zasadzie grawimetrycznej, całą ilość zawieszonego w powietrzu aerozolu, nawet w przypadku gdy duża ilość aerozolu nie jest wchłaniana. Należy przeprowadzać częste analizy wielkość cząsteczki w czasie rozwijania systemu wytwarzania w celu zapewnienia stabilności aerozolu, a następnie tak często, jak to konieczne podczas badań dla ustalenia odpowiedniego składu cząsteczek podlegających dystrybucji, których działaniu poddane są zwierzęta.

Czas trwania badań

Czas trwania części badań dotyczących rakotwórczości obejmuje większą część normalnej długości życia badanych zwierząt. Zakończenie testu powinno nastąpić w 18 miesiącu dla myszy i chomików oraz w 24 miesiącu dla szczurów; jednakże dla niektórych szczepów zwierząt o większej długowieczności i/lub współczynniku samorzutnej rakotwórczości, zakończenie badań powinno nastąpić w 24 miesiącu dla myszy i chomików oraz w 30 miesiącu dla szczurów. Ewentualnie, zakończenie takich przedłużonych badań jest do przyjęcia w przypadku gdy liczba osobników, które przetrwały w grupie najniższej wielkości dawki lub grupie kontrolnej, osiągnęła 25 %. W przypadku zakończenia badania, które wykazało widoczną różnicę reakcji ze względu na płeć, każdą płeć należy uwzględnić oddzielnie. W przypadku przedwczesnego zgonu jedynie osobników z grupy najwyższego dawkowania z przyczyn oczywistej toksyczności, nie powoduje to zakończenia badań pod warunkiem, iż objawy toksyczności nie stwarzają problemów w innych grupach. Odnośnie negatywnych, ale akceptowalnych wyników badań, nie więcej niż 10 % osobników danej grupy może zostać utracone z powodu autolizy, kanibalizmu lub problemów z zarządzaniem, a liczba osobników wszystkich grup, które przetrwały badanie, jest nie mniejsza niż 50 % przy 18 miesiącach dla myszy i chomików i 24 miesiącach dla szczurów.

Grupy satelitarne w ilości 20 osobników danej płci i 10 osobników danej płci z powiązanej grupy kontrolnej wykorzystywane do badania toksyczności chronicznej powinny być badane przez co najmniej 12 miesięcy. Zwierzęta te powinny być przeznaczone do uśmiercenia w celu zbadania patologii związanych z działaniem substancji testowej, nieskomplikowanych zmianami genorologicznymi.

Procedura

Obserwacje

Należy prowadzić codzienne obserwacje zwierząt w klatkach, które powinny obejmować zmiany zachodzące na ich skórze i futrze, zmiany oczu i błony śluzowej a także zmiany układu oddechowego, krążenia oraz autonomicznego i centralnego układu nerwowego, czynności somatomotorycznych oraz schematów zachowań.

Badania kliniczne należy przeprowadzać w odpowiednich odstępach czasu na zwierzętach w satelitarnej grupie doświadczalnej (grupach).

Regularne obserwacje zwierząt są konieczne w celu zapewnienia, o ile to możliwe, że nie występują straty w zwierzętach w wyniku takich przypadków jak kanibalizm, autoliza tkanek lub nieprawidłowe umieszczenie. Zwierzęta konające powinny być usuwane i poddawane sekcji zwłok po stwierdzeniu takiego faktu.

Należy odnotować objawy kliniczne włączając zmiany neurologiczne i oczne oraz śmiertelność wszystkich zwierząt. Należy zwrócić specjalną uwagę na rozwój nowotworów: należy odnotować czas rozpoczęcia, umieszczenie, wymiary, wygląd oraz dalszy rozwój każdego bardzo widocznego lub ewidentnego nowotworu; należy odnotować początek powstania oraz rozwój warunków toksyczności.

Należy dokonać cotygodniowych pomiarów spożycia pokarmu (oraz spożycia wody, w przypadku gdy substancja testowa podawana jest w wodzie pitnej) w okresie pierwszych 13 tygodni po rozpoczęciu badań i następnie w odstępach trzymiesięcznych chyba że stan zdrowia lub zmiany wagi ciała wymuszą inną procedurę.

Należy odnotować wagę ciała indywidualnie dla każdego zwierzęcia raz w tygodniu podczas okresu pierwszych 13 tygodni okresu badania i następnie, co najmniej raz na cztery tygodnie.

Badania kliniczne

Hematologia

Badanie hematologiczne (np. badanie składu hemoglobiny, hematokrytu, całkowitej ilości krwinek czerwonych, całkowitej ilości krwinek białych, płytek krwi lub inne pomiary wskaźników krzepliwości krwi) należy przeprowadzić w przeciągu trzech miesięcy, sześciu miesięcy, a następnie w sześciomiesięcznych odstępach i po zakończeniu badań na próbkach krwi pobranych od 10 szczurów/płeć wszystkich grup. Jeżeli możliwe, próbki należy pobrać od tych samych szczurów w każdym przedziale.

Jeżeli obserwacje zwierząt w klatkach wskazują na pogorszenie stanu zdrowia zwierząt podczas badań, należy przeprowadzić obraz białokrwinkowy u zarażonych zwierząt.

Obraz białokrwinkowy należy przeprowadzić na próbkach pobranych od zwierząt z grupy najwyższego dawkowania i kontrolnych. Obrazy białokrwinkowe przeprowadzane są w grupie(grupach) niższego dawkowania jedynie w przypadku wystąpienia dużej różnicy między grupą najwyższego dawkowania a kontrolnymi, lub w przypadku wystąpienia patologicznych wyników badań.

Analiza moczu

Należy pobrać próbki moczu od 10 szczurów/płeć wszystkich grup, jeżeli możliwe od tych samych szczurów w tych samych odstępach czasu celem wykonania analizy hematologicznej. Należy dokonać następujących ustaleń dla poszczególnych zwierząt lub dla połączonych próbek/płeć/grupa gryzoni:

— wygląd: rozmiary i waga poszczególnych zwierząt,

— białko, glukoza, ketony, krew utajona w kale (półilościowo),

— badanie mikroskopowe szlamu (półilościowo).

Chemia kliniczna

W sześciomiesięcznych odstępach i po zakończeniu badania, próbki krwi pobierane są od wszystkich gatunków innych niż gryzonie i od 10 szczurów/płeć wszystkich grup, w celu wykonania pomiarów chemii klinicznej, jeżeli możliwe od tych samych szczurów w każdym przedziale. Ponadto należy pobrać próbki przed rozpoczęciem badań od gatunków innych niż gryzonie. Z próbek tych przygotowywana jest plazma krwi i należy dokonać następujących ustaleń:

— stężenie białka ogólnego,

— stężenie albuminy,

— badanie funkcjonowania wątroby (takie jak działanie fosfatazy alkaicznej, działanie transaminazy pirogronianowo-glutaminowej [1]) i czynność transaminazy szczawiowooctowoglutamylowej [2])), transpeptydaza gammaglutamylowa, dekarboksylaza ornityny,

— metabolizm węglowodanów, taki jak stężenie glukozy we krwi,

— badanie funkcjonowania nerki, takie jak azotan mocznika krwi.

[1] Obecnie znane pod nazwą aminontransferaza alaninowa surowicy.
[2] Obecnie znane pod nazwą aminotransferaza asparaginianowa surowicy.

Całkowita sekcja zwłok

Należy przeprowadzić pełną sekcję zwłok na wszystkich zwierzętach, włączając zwierzęta martwe w czasie trwania badania lub te, które zostały uśmiercone po stwierdzeniu stanu konania. Przed uśmierceniem zwierząt, należy pobrać próbki krwi od wszystkich zwierząt w celu przeprowadzenia obrazów białokrwinkowych. Wszelkie widoczne nowotwory lub zmiany o podłożu nowotworowym należy zachować. Należy podjąć próbę skorelowania wyników całości obserwacji z wynikami badań mikroskopowych.

Wszystkie organy i tkanki należy zachować w celu przeprowadzenia badania histopatologicznego. Zazwyczaj dotyczy ono następujących organów i tkanek: mózg [1] (rdzeń/most, móżdżek, kora mózgowa), przysadka mózgowa, tarczyca (włączając przytarczycę), grasica, płuca (włączając tchawicę), serce, aorta, gruczoły ślinowe, wątroba [1], śledziona, nerki [1], nadnercza [1], przełyk, żołądek, dwunastnica, jelito czcze, talerz, jelito ślepe, okrężnica, odbytnica, macica, pęcherz moczowy, węzły chłonne, trzustka, gruczoły płciowe [1], dodatkowe organy genitaliów, żeńskie gruczoły malene, skóra, umięśnienie, nerwy obwodowe, rdzeń kręgowy (szyjny, śródpiersiowy, lędźwiowy), mostek wraz ze szpikiem kostnym, kość udowa (włączając staw) i oczy.

Chociaż napełnienie płuc i pęcherza moczowego w utrwalaczu jest optymalnym sposobem zachowania niniejszych tkanek, napełnienie płuc w badaniach inhalacyjnych jest wymogiem koniecznym dla właściwego badania histopatologicznego. W badaniach szczególnych, takich jak badania inhalacyjne, należy dokonać badania całości dróg oddechowych, włączając nos, gardło i krtań.

W przypadku przeprowadzania innych badań klinicznych, otrzymane informacje należy udostępnić przed badaniem mikroskopowym, ponieważ mogą dostarczyć ważnych wskazówek patologowi.

Histopatologia

W odniesieniu do części badań dotyczących toksyczności chronicznej:

Należy przeprowadzić szczegółowe badania wszystkich zachowanych organów wszystkich zwierząt z satelitarnej grupy najwyższego dawkowania i z grup kontrolnych. W przypadku wykrycia patologii związanej z działaniem substancji testowej w satelitarnej grupie najwyższego dawkowania, dane organy wszystkich zwierząt z wszystkich satelitarnych grup doświadczalnych powinny zostać poddane pełnemu i szczegółowemu badaniu histologicznemu, a także organy zwierząt grup doświadczalnych w części badań dotyczących rakotwórczości w chwili ich zakończenia.

W odniesieniu do części badań dotyczących rakotwórczości:

a) pełna histopatologia powinna zostać przeprowadzona na organach i tkankach wszystkich padłych lub uśmierconych zwierząt w trakcie trwania badania i wszystkich zwierząt w grupie kontrolnej i grupach najwyższego dawkowania;

b) wszelkie bardzo widoczne nowotwory lub zmiany patologiczne o przypuszczalnym podłożu nowotworowym pojawiające się w jakimkolwiek organie należy zbadać mikroskopowo we wszystkich grupach;

c) w przypadku istotnej różnicy w częstotliwości występowania zmian nowotworowych w grupach najwyższego dawkowania i w grupach kontrolnych, należy przeprowadzić badania histopatologiczne na danym szczególnym organie i tkance w innych grupach badanych;

d) jeżeli ilość zwierząt pozostałych przy życiu w grupie najwyższego dawkowania jest znacznie niższa niż w grupie kontrolnej, wówczas należy przeprowadzić pełne badanie następnej grupy niższego dawkowania;

e) w przypadku istnienia dowodów wywołania toksyczności lub innych skutków, które mogą wpływać na reakcję nowotworową w grupie najwyższego dawkowania, należy przeprowadzić pełne badanie następnej grupy niższego dawkowania.

2. DANE

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wskazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę zwierząt wykazujących zmiany nowotworowe lub skutki toksyczności wykryte podczas badania, czas wykrycia oraz liczbę zwierząt, u których wykryto nowotwory po dokonaniu uśmiercenia. Wyniki powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— gatunek lub szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,

[1] Organy te, pochodzące od dziesięciu zwierząt danej płci i grupy odnośnie do gryzoni, powinny zostać zważone.

— warunki badania:

Opis urządzeń badawczych:

włączając projekt, typ, wymiary, źródło powietrza, system wytwarzania cząstek stałych zawieszonych w gazie i aerozoli, metoda klimatyzowania powietrza, oczyszczanie powietrza z komory i metoda umieszczania zwierząt w komorze badawczej w razie jej stosowania. Należy opisać sprzęt do pomiaru temperatury, wilgotności, w miarę potrzeb, stabilność stężenia aerozoli lub wielkości cząsteczki.

Dane dotyczące badania:

Powinny zostać umieszczone w tabeli i przedstawione jako wartość średnia wraz z pomiarem zmiennej (np. odchylenie standardowe) i powinny zawierać:

a) wskaźnik przepływu powietrza przez sprzęt inhalacyjny;

b) temperatura i wilgotność powietrza;

c) nominalne stężenia (całkowita ilość substancji testowej wprowadzana do sprzętu inhalacyjnego, podzielona przez ilość powietrza);

d) charakter nośnika, jeżeli był użyty;

e) właściwe stężenia w badanej strefie oddechowej;

f) średnie wielkości cząsteczki (gdzie sytuacja tego wymaga),

— poziomy dawek (charakter nośnika, jeżeli był użyty) i stężenia,

— dane dotyczące częstotliwości występowania nowotworu w odniesieniu do płci, dawki i rodzaju nowotworu,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym czy zwierzęta przetrwały do czasu ich zakończenia, włączając grupę satelitarną,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę,

— opis skutków toksyczności lub innych,

— czas obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— wyniki badań oftamologicznych,

— dane dotyczące wagi ciała i pożywienia,

— zastosowane testy hematologiczne i wszystkie ich wyniki,

— zastosowane badanie biochemii klinicznej i wszystkie wyniki (włączając wszelką analizę moczu),

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań histopatologicznych,

— statystyczne ujęcie wyników wraz z opisem stosowanych metod,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCJI JEDNEGO POKOLENIA

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Substancja testowa podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samcom należy podawać dawkę w okresie wzrostu i przez co najmniej jeden pełny cykl spermatogenezy (około 56 dni u myszy i 70 dni u szczura), w celu wywołania przez substancję testową wszelkich negatywnych skutków na spermatogenezie.

Samice z pokolenia rodziców P powinny być poddane dawkowaniu, przez co najmniej dwa pełne cykle rujowe w celu wywołania przez substancję testową wszelkich negatywnych skutków na cykl rujowy. Następnie zwierzęta zostają pokryte. Substancja testowa jest podawana obu płciom w okresie krycia a następnie jedynie samicom w okresie ciąży oraz przez okres ssania.

W celu podania substancji przez drogi oddechowe metoda będzie wymagać modyfikacji.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych. Zwierzęta podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania, przez co najmniej 5 dni przed rozpoczęciem badania.

Zalecane jest podawanie substancji testowej w pożywieniu lub w wodzie pitnej. Akceptowane są również inne drogi podawania substancji testowej. Ta sama metoda podawania substancji testowej powinna być stosowana do wszystkich zwierząt w trakcie odpowiedniego okresu badania. W przypadku użycia jakiegokolwiek nośnika lub innych dodatków w celu usprawnienia dawkowania, należy upewnić się, iż nie powodują żadnych skutków toksyczności.

Dawkowanie należy przeprowadzać siedem dni w tygodniu.

Zwierzęta badane

Wybór gatunków

Pożądanymi gatunkami są szczur i mysz. Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta, które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności. Badane zwierzęta należy scharakteryzować ze względu na gatunek, szczep, płeć, wagę i/lub wiek.

W celu odpowiedniego oszacowania płodności należy poddać badaniu zarówno samice, jak i samce. Wszystkie zwierzęta badane i kontrolne należy odstawić od ssania przed rozpoczęciem dawkowania.

Liczba i płeć

Każda grupa doświadczalna i kontrolna powinna składać się z takiej liczby zwierząt, aby znalazło się w nich około 20 samic pod koniec ciąży.

Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż i potomstwa w celu zapewnienia znaczącej oceny wpływu substancji na płodność, ciążę i zachowanie macierzyńskie w pokoleniu zwierząt rodziców P i zwierząt ssących, wzrost i rozwój potomstwa F_1 w okresie od chwili poczęcia do zakończenia ssania.

Warunki badania

Pożywienie i woda powinny być dostępne bez ograniczeń. Tuż przed porodem ciężarne samice powinny być umieszczone w klatkach porodowych lub matczynych zaopatrzonych w materiał do zrobienia gniazda.

Poziomy dawkowania

Należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i grupę kontrolną. W przypadku użycia nośnika w podawaniu substancji testowej, grupie kontrolnej należy podać nośnik o najwyższej wielkości dawki. W przypadku gdy substancja testowa zmniejsza pobieranie lub wykorzystanie pożywienia, może być niezbędne dołączenie odpowiednio żywionej grupy kontrolnej. Jeżeli dawka nie jest ograniczona fizyczno-chemicznymi lub biologicznymi właściwościami substancji, najwyższa wielkość dawki powinna wywoływać toksyczność, ale nie śmiertelność w grupie zwierząt rodziców P. Średnia dawka powinna wywoływać minimalne skutki toksyczności przypisane działaniu substancji testowej, a najniższa dawka nie powinna wywoływać żadnych niekorzystnych skutków u rodziców lub potomstwa. W przypadku substancji podawanej za pomocą dozownika lub w kapsułce, dawka podawana każdemu zwierzęciu powinna być oparta na indywidualnej wadze ciała zwierzęcia i dostosowywana raz w tygodniu z uwzględnieniem zmian wagi ciała zwierzęcia. Poziom dawkowania dla samic w okresie ciąży może być oparta na wadze ciała w dniu 0 lub 6 dniu ciąży, w razie potrzeby.

Test graniczny

W przypadku substancji o niskiej toksyczności, jeżeli poziom dawki wynoszący co najmniej 1000 mg/kilogram nie powoduje żadnego szkodliwego wpływu na zdolność reprodukcyjną, badania przy zastosowaniu innych poziomów dawek mogą być uznane za niekonieczne. Jeżeli badania wstępne przy wysokim poziomie dawki, z wyraźnymi dowodami toksyczności matki, nie wykazują żadnego szkodliwego wpływu na płodność, badania przy zastosowaniu innych poziomów dawek mogą być uznane za niekonieczne.

Przeprowadzenie badania

Harmonogramy badań

Codzienne stosowanie dawki u rodzicielskich samców P powinno rozpocząć się po przekroczeniu od pięciu do dziewięciu tygodni życia po zaprzestaniu ssania i aklimatyzacji przez okres co najmniej pięciu dni. W przypadku szczurów, dawkowanie odbywa się przez okres 10 tygodni przed okresem krycia (w przypadku myszy osiem tygodni). Samce należy uśmiercić i zbadać na końcu okresu krycia albo, ewentualnie, mogą być zachowane, podając im pożywienie wykorzystywane w badaniu w celu ewentualnej produkcji drugiego miotu, a następnie powinny być uśmiercone i zbadane w okresie poprzedzającym zakończenie badań. W przypadku rodzicielskich samic P dawkowanie powinno rozpocząć się po co najmniej pięciodniowym okresie aklimatyzacji i być kontynuowane przez okres co najmniej dwóch tygodni przed rozpoczęciem krycia. Codzienne dawkowanie rodzicielskich samic P powinno być kontynuowane przez trzytygodniowy okres krycia, ciąży aż do czasu zaprzestania ssania potomstwa F_1. Należy rozważyć zmodyfikowanie zasad dawkowania przy uwzględnieniu dostępnych informacji na temat substancji testowej, w szczególności pobudzania przez nią metabolizmu lub bioakumulacji.

Procedura krycia

W badaniach toksyczności reprodukcji można zastosować procedurę krycia zarówno 1:1 (jeden samiec i jedna samica) jak i 1:2 (jeden samiec i dwie samice).

W oparciu o procedurę krycia 1:1, jedną samicę należy umieścić z tym samym samcem aż do momentu pojawienia się ciąży lub przez okres trzech tygodni. Każdego dnia rano samice należy poddać badaniu na obecność spermy lub czopów nasienia w pochwie. Dzień 0 danej ciąży jest określany w chwili wykrycia spermy lub czopu nasienia w pochwie.

Należy ustalić przyczynę wyraźnego braku płodności w odniesieniu do par, które nie zainicjują krycia. Powyższe może obejmować takie procedury, jak ponowne, dodatkowe krycie z reproduktorami matek, mikroskopowe badanie organów rozrodczych oraz badania cyklu rujowego i cyklu spermatogenezy.

Wielkość miotu

Zwierzęta poddawane dawkowaniu w okresie badań płodności są dopuszczane do miotu i wychowują swoje potomstwo do chwili zaprzestania ssania bez normalizacji miotów.

W przypadku dokonania normalizacji zaleca się następującą procedurę. Między 1 a 4 dniem po porodzie rozmiar każdego miotu może zostać dostosowany przez wyeliminowanie dodatkowych młodych w miocie, na tyle na ile to możliwe, cztery samice i cztery samce na miot. W każdym przypadku gdy liczba młodych samców lub samic uniemożliwia zachowanie czterech osobników danej płci w każdym miocie, akceptowane jest częściowe dostosowanie (np. pięć samców i trzy samice). Nie należy przeprowadzać dostosowania w odniesieniu do miotów o liczbie osobników mniejszej niż osiem.

Obserwacje

Przez cały okres badań każde zwierzę powinno być obserwowane co najmniej raz dziennie. Należy odnotować zmiany w zachowaniu mające związek z badaniami, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie objawy toksyczności, włączając śmiertelność. W okresie poprzedzającym krycie oraz w okresach krycia, spożycie żywności może być kontrolowane codziennie. Po porodzie oraz podczas okresu laktacji, pomiary spożycia żywności (i pomiary spożycia wody, w przypadku gdy substancja testowa podawana jest w wodzie pitnej) należy sporządzać w tym samym dniu co ważenie miotu. Rodzicielskie samce i samice P należy ważyć w pierwszym dniu rozpoczęcia dawkowania i następnie w odstępach tygodniowych. Niniejsze uwagi należy odnotować indywidualnie dla każdego dorosłego zwierzęcia.

Czas trwania ciąży należy obliczać, począwszy od dnia 0. Każdy miot należy zbadać, jeżeli możliwe natychmiast po porodzie celem ustalenia liczby oraz płci młodych, liczby martwo urodzonych, żywo urodzonych oraz obecność rażących nieprawidłowości.

Martwe młode oraz młode uśmiercone w 4 dniu należy zachować celem wykonania badań odnośnie do ewentualnych wad. Należy przeliczyć żywe młode i zważyć mioty nazajutrz po porodzie oraz w 4 i 7 dniu a następnie w odstępach tygodniowych aż do czasu zakończenia badań gdzie zwierzęta należy zbadać indywidualnie. Należy odnotować obserwowalne nieprawidłowości fizyczne lub dotyczące zachowania u matek lub potomstwa.

Patologia

Sekcja zwłok

W chwili uśmiercenia lub zgonu zwierzęcia podczas badania, zwierzęta pokolenia rodziców P powinny zostać poddane badaniom mikroskopowym w celu wykrycia wszelkich strukturalnych nieprawidłowości lub zmian patologicznych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na organy systemu rozrodczego. Należy zbadać martwe lub konające młode w celu wykrycia uszkodzeń.

Histopatologia

Jajniki, macica, szyjka macicy, pochwa, jądra, najądrza, kanaliki nasienne, gruczoł krokowy, gruczoł opuszkowo-cewkowy, przysadka mózgowa i organ (organy) docelowe wszystkich zwierząt P należy zachować celem poddania badaniu mikroskopowemu. W przypadku gdy niniejsze organy nie zostały przebadane w trakcie innych badań z wykorzystaniem wielu poziomy dawek, należy przeprowadzić ich badanie u wszystkich zwierząt grupy najwyższego dawkowania i kontrolnej, które padły w trakcie badań, w takim stopniu w jakim jest to możliwe.

Organy takich zwierząt wykazujące objawy nieprawidłowości powinny zostać zbadane u wszystkich zwierząt P. W tych przypadkach badanie mikroskopowe należy przeprowadzić na wszystkich tkankach wykazujących zmiany patologiczne. Jak sugerowano zgodnie z procedurami krycia, organy rozrodcze zwierząt podejrzanych o brak płodności mogą być poddane badaniu mikroskopowemu.

2. DANE

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wskazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę płodnych samców, liczbę ciężarnych samic, rodzaje zmian i procent zwierząt wykazujących każdy rodzaj zmian.

Jeżeli możliwe, wyniki numeryczne powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— wykorzystany gatunek/szczep,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę, włączając płodność, ciążę i zdolność utrzymania się przy życiu,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu planowanego uśmiercenia lub zakończenia badań,

— tabela przedstawiająca wagę każdego miotu, średnią wagę młodych i wagę poszczególnych młodych przy zakończeniu badań,

— wpływ toksyczności lub innych skutków na reprodukcję, potomstwo i rozwój poporodowy,

— dzień obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— dane dotyczące wagi ciała dla zwierząt P,

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań mikroskopowych,

— statystyczne ujęcie wyników, tam gdzie jest to stosowane,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE TOKSYCZNOŚCI REPRODUKCJI DWÓCH POKOLEŃ

1. **METODA**

1.1 **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Substancja testowa podawana jest w stopniowanych dawkach kilku grupom samców i samic. Samcom z pokolenia rodziców P należy podawać dawkę w okresie wzrostu i przez co najmniej jeden pełny cykl spermatogenezy (około 56 dni u myszy i 70 dni u szczura) w celu wywołania przez substancję testową wszelkich negatywnych skutków na spermatogenezie.

Samice z pokolenia rodziców P powinny być poddane dawkowaniu przez co najmniej dwa pełne cykle rujowe w celu wywołania przez substancję testową wszelkich negatywnych skutków na cykl rujowy. Następnie zwierzęta zostają pokryte. Substancja testowa jest podawana obu płciom w okresie krycia, a następnie jedynie samicom w okresie ciąży oraz przez okres ssania. Po zaprzestaniu ssania należy kontynuować podawanie substancji testowej potomstwu F_1 w okresie ich rozwoju do osiągnięcia dorosłości, momentu kojarzenia w pary i produkcji potomstwa F_2, do chwili zaprzestania ssania potomstwa F_2. W celu podania substancji przez drogi oddechowe, metoda będzie wymagać modyfikacji.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Przed rozpoczęciem badania młode zdrowe zwierzęta są losowo przydzielane do grup badanych i kontrolnych. Zwierzęta rodzicielskie P podlegają warunkom przebywania i żywieniowym ustalonym do celów badania przez co najmniej pięć dni przed rozpoczęciem badania. Zalecane jest podawanie substancji testowej w pożywieniu lub w wodzie pitnej. Akceptowane są również inne drogi podawania substancji testowej. Ta sama metoda podawania substancji testowej powinna być stosowana do wszystkich zwierząt w trakcie całego okresu badanego. W przypadku użycia jakiegokolwiek nośnika lub innych dodatków w celu usprawnienia dawkowania, należy upewnić się, iż nie powodują żadnych skutków toksyczności. Dawkowanie należy przeprowadzać siedem dni w tygodniu.

Zwierzęta badane: wybór gatunków

Pożądanymi gatunkami są szczur i mysz.

Należy wykorzystać zdrowe zwierzęta P, które nie były wcześniej poddawane procedurom badawczym. Nie należy stosować szczepów o niskiej płodności. Należy scharakteryzować gatunek, szczep, płeć, wagę i/lub wiek badanych zwierząt.

W celu odpowiedniego oszacowania płodności, należy poddać badaniu zarówno samice jak i samce. Wszystkie zwierzęta badane i kontrolne należy odstawić od ssania przed rozpoczęciem dawkowania.

Liczba i płeć

Każda grupa doświadczalna i kontrolna powinna składać się z takiej liczby zwierząt, aby znalazło się w nich około 20 samic przy końcu lub pod koniec ciąży. Celem jest wyprodukowanie odpowiedniej liczby ciąż i potomstwa w celu zapewnienia znaczącej oceny wpływu substancji na płodność, ciążę i zachowanie macierzyńskie oraz ssanie, wzrost i rozwój potomstwa F_1 od poczęcia do dojrzałości, i rozwój ich potomstwa F_2 do zakończenia ssania.

Warunki badania

Pożywienie i woda powinny być dostępne bez ograniczeń. Tuż przed porodem ciężarne samice powinny być umieszczone w klatkach porodowych lub matczynych zaopatrzonych w materiał do zrobienia gniazda.

Poziom dawkowania

Należy wykorzystać co najmniej trzy grupy badane i grupę kontrolną. W przypadku użycia nośnika do podawania substancji testowej, grupie kontrolnej należy podać nośnik o najwyższej wielkości dawki. W przypadku gdy testowa substancja zmniejsza pobieranie lub wykorzystanie pokarmu, może być niezbędne dołączenie odpowiednio żywionej grupy kontrolnej. Jeżeli dawka nie jest ograniczona fizyczno-chemicznymi lub biologicznymi właściwościami substancji, najwyższy poziom dawki powinien wywoływać toksyczność, ale nie śmiertelność w grupie zwierząt rodziców P. Średnia dawka powinna wywoływać minimalne skutki toksyczności przypisane działaniu substancji testowej, a najniższa dawka nie powinna wywoływać żadnych niekorzystnych skutków u rodziców lub potomstwa. W przypadku substancji podawanej za pomocą dozownika lub w kapsułce, dawka podawana każdemu zwierzęciu powinna być oparta na indywidualnej wadze ciała zwierzęcia i dostosowywana raz w tygodniu z uwzględnieniem zmian wagi ciała zwierzęcia. Poziom dawkowania dla samic w okresie ciąży może być oparty na wadze ciała w dniu 0 lub 6 dniu ciąży, w razie potrzeby.

Test graniczny

W przypadku substancji o niskiej toksyczności, jeżeli poziom dawki wynoszący co najmniej 1000 mg/kilogram nie powoduje żadnego szkodliwego wpływu na zdolność reprodukcyjną, badania przy zastosowaniu innych poziomów dawek mogą być uznane za niekonieczne. Jeżeli badania wstępne przy wysokiej wielkości dawki, z wyraźnymi objawami toksyczności matki, nie wykazują żadnego szkodliwego wpływu na płodność, badania przy zastosowaniu innych poziomy dawek mogą być uznane za niekonieczne.

Przeprowadzenie badania

Harmonogram badań

Codzienne stosowanie dawki u rodzicielskich samców P powinno rozpocząć się po przekroczeniu pięciu do dziewięciu tygodni życia po zaprzestaniu ssania i aklimatyzacji przez okres co najmniej pięciu dni. W przypadku szczurów, dawkowanie odbywa się przez okres 10 tygodni przed okresem krycia (w przypadku myszy, osiem tygodni). Samce należy uśmiercić i zbadać na końcu okresu krycia albo, ewentualnie, mogą być zachowane, podając pożywienie wykorzystywane w badaniu, w celu ewentualnej produkcji drugiego miotu, a następnie powinny być uśmiercone i zbadane w okresie poprzedzającym zakończenie badań.

W przypadku rodzicielskich samic P dawkowanie powinno rozpocząć się po co najmniej pięciodniowym okresie aklimatyzacji i być kontynuowane przez okres co najmniej dwóch tygodni przed rozpoczęciem krycia. Codzienne dawkowanie rodzicielskich samic P powinno być kontynuowane przez trzytygodniowy okres krycia, ciąży aż do czasu zaprzestania ssania potomstwa F_1. Należy rozważyć zmodyfikowanie zasad dawkowania przy uwzględnieniu dostępnych informacji na temat testowej substancji, w szczególności pobudzania przez nią metabolizmu lub bioakumulacji.

Dawkowanie zwierząt F_1 rozpoczyna się po zakończeniu ssania i kończy się w chwili ich uśmiercenia.

Procedura krycia

W badaniach toksyczności reprodukcji można zastosować procedurę krycia zarówno 1:1 (jeden samiec i jedna samica), jak i 1:2 (jeden samiec i dwie samice).

W oparciu o procedurę krycia 1:1, jedną samicę należy umieścić z tym samym samcem aż do chwili pojawienia się ciąży lub przez okres trzech tygodni. Każdego dnia rano samice należy poddać badaniu na obecność spermy lub czopu nasienia w pochwie. Dzień 0 danej ciąży jest określany w momencie wykrycia spermy lub czopu nasienia w pochwie. Uwzględniając spermogenezę, pokolenie F_1 nie powinno być kryte do osiągnięcia wieku 11 tygodni dla myszy, 13 tygodni dla szczurów. W celu pokrycia potomstwa F_1, jeden samiec i jedna samica są losowo wybierane z każdego miotu w celu pokrycia młodego z innego miotu z grupy tej samej wielkości dawki w celu wyprodukowania potomstwa F_2. Samice i samce F_1, które nie zostały wybrane do krycia są uśmiercane po zakończeniu ssania.

Należy ustalić przyczynę wyraźnego braku płodności w odniesieniu do par, które nie zainicjują krycia. Powyższe może obejmować takie procedury jak ponowne, dodatkowe krycie z reproduktorami matek, mikroskopowe badanie organów rozrodczych, oraz badania cyklu rujowego i cyklu spermatogenezy.

Wielkość miotu

Zwierzęta poddawane dawkowaniu w okresie badań płodności są dopuszczane do miotu i wychowują swoje potomstwo do chwili zaprzestania ssania bez normalizacji miotów.

W przypadku dokonania normalizacji zaleca się następującą procedurę. Między 1 a 4 dniem po porodzie rozmiar każdego miotu może zostać dostosowany przez wyeliminowanie dodatkowych młodych w miocie, na tyle na ile to możliwe, cztery samice i cztery samce na miot. W każdym przypadku gdy liczba młodych samców lub samic uniemożliwia zachowanie czterech osobników danej płci w każdym miocie, akceptowane jest częściowe dostosowanie (np. pięć samców i trzy samice). Nie należy przeprowadzać dostosowania odnośnie do miotów o liczbie osobników mniejszej niż osiem. Dostosowanie miotów F_2 przeprowadza się w ten sam sposób.

Obserwacje

Przez cały okres badania każde zwierzę powinno być obserwowane co najmniej raz dziennie. Należy odnotować zmiany w zachowaniu mające związek z badaniami, objawy trudnego lub długotrwałego porodu oraz wszelkie objawy toksyczności, włączając śmiertelność. W okresie poprzedzającym krycie oraz w okresach krycia, spożycie żywności może być kontrolowane raz w tygodniu. Dodatkowo w okresie ciąży spożycie pokarmu może być kontrolowane raz dziennie. Po porodzie oraz w podczas okresu laktacji, pomiary spożycia żywności należy sporządzać w tym samym dniu co ważenie miotów. Rodzicielskie zwierzęta (P i F_1) należy ważyć w pierwszym dniu po rozpoczęciu dawkowania i następnie w odstępach tygodniowych. Niniejsze uwagi należy odnotować indywidualnie dla każdego dorosłego zwierzęcia.

Czas trwania ciąży należy obliczać, począwszy od dnia 0. Każdy miot należy zbadać, jeżeli możliwe, natychmiast po porodzie celem ustalenia liczby oraz płci młodych, liczby martwo urodzonych, żywo urodzonych oraz wystąpienie znacznych nieprawidłowości.

Martwe młode oraz młode uśmiercone w 4 dniu należy zachować celem zbadania ewentualnych uszkodzeń. Należy przeliczyć żywe młode i zważyć mioty nazajutrz po porodzie oraz w 4 i 7 dniu, a następnie w odstępach tygodniowych, do czasu zakończenia badań, kiedy to zwierzęta należy zbadać indywidualnie. Należy odnotować dające się zaobserwować nieprawidłowości fizyczne lub dotyczące zachowania u matek lub potomstwa.

Patologia

Sekcja zwłok

Wszystkie dorosłe zwierzęta P i F_1 powinny zostać uśmiercone, jeżeli nie będą już dłużej potrzebne, celem oszacowania wpływu na reprodukcję. Potomstwo F_1, które nie zostało wybrane do krycia i całe potomstwo F_2 należy uśmiercić po zaprzestaniu ssania.

W chwili uśmiercenia lub zgonu zwierzęcia podczas badania, wszystkie zwierzęta pokolenia rodziców (P i F_1) powinny zostać poddane badaniom mikroskopowym w celu wykrycia wszelkich strukturalnych nieprawidłowości lub zmian patologicznych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na organy systemu rozrodczego. Należy zbadać martwe lub konające młode w celu wykrycia uszkodzeń.

Histopatologia

Jajniki, macica, szyjka macicy, pochwa, jądra, najądrza, kanaliki nasienne, gruczoł krokowy, gruczoł opuszkowo-cewkowy, przysadka mózgowa i organ(-y) docelowy(-e) wszystkich zwierząt P i F_1 należy zachować celem poddania badaniu mikroskopowemu. W przypadku gdy niniejsze organy nie zostały przebadane w trakcie innych badań z wykorzystaniem wielu poziomy dawek, należy przeprowadzić ich badanie u wszystkich zwierząt grupy najwyższego dawkowania i kontrolnej P i F_1, u zwierząt wybranych do krycia oraz, jeżeli możliwe u zwierząt, które padły w trakcie badań. Organy takich zwierząt wykazujące objawy nieprawidłowości powinny zostać zbadane u zwierząt z grup innego dawkowania. W tych przypadkach badanie mikroskopowe należy przeprowadzić na wszystkich tkankach wykazujących zmiany patologiczne. Jak sugerowano zgodnie z procedurami krycia, organy rozrodcze zwierząt podejrzanych o brak płodności mogą być poddane badaniu mikroskopowemu.

2. **DANE**

Obróbka wyników

Dane powinny zostać podsumowane w formie tabeli, wykazującej liczbę zwierząt każdej badanej grupy na początku badań, liczbę ciężarnych zwierząt, rodzaje zmian i odsetek zwierząt wykazujących każdy rodzaj zmiany.

Jeżeli możliwe, wyniki numeryczne powinny zostać oszacowane właściwą metodą statystyczną. Można zastosować każdą uznaną metodę statystyczną.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1 **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań zawiera, jeżeli możliwe, następujące informacje:

— wykorzystany gatunek/szczep,

— dane dotyczące reakcji na toksyczność ze względu na płeć i dawkę, włączając płodność, ciążę i wskaźniki zdolności utrzymania się przy życiu,

— czas zgonu podczas badań lub informacja o tym, czy zwierzęta przetrwały do czasu zakończenia badań,

— tabela przedstawiająca wagę każdego miotu, średnią wagę młodych i wagę poszczególnych młodych na zakończenie badań,

— wpływ toksyczności lub innych skutków na reprodukcję, potomstwo i rozwój poporodowy,

— dzień obserwacji każdego nietypowego objawu i późniejszego postępowania,

— dane dotyczące wagi ciała dla zwierząt P i F_1 wybranych do krycia,

— wyniki badań sekcji zwłok,

— szczegółowy opis wszystkich wyników badań mikroskopowych,

— statystyczne ujęcie wyników, tam gdzie jest to stosowane,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

TOKSYKOKINETYKA

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Substancja testowa podawana jest właściwą drogą. W zależności od celu badań, substancja testowa może być podawana jednorazowo lub w wielu dawkach przez wyznaczone okresy czasu jednej lub kilku grupom zwierząt badanych. Następnie, w zależności od rodzaju badań, ustalana jest ilość substancji testowej i/lub metabolitów w płynach ustrojowych, tkankach i/lub wydalinach.

Badania mogą być przeprowadzane z użyciem „nieetykietowanych" lub „etykietowanych" postaci substancji testowej. W przypadku użycia etykiety, należy umieścić ją na substancji w taki sposób, aby umożliwić dostarczenie jak największej ilości informacji o przemianie badanego składnika.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Zdrowe, młode, dorosłe zwierzęta są aklimatyzowane do warunków laboratoryjnych, co najmniej przez okres pięciu dni przed rozpoczęciem badania. Przed rozpoczęciem badania zwierzęta są dobierane losowo i przydzielane do grup badanych. W wyjątkowych wypadkach można wykorzystać bardzo młode, ciężarne lub niebadane zwierzęta.

Warunki badania

Zwierzęta badane

Badania toksykokinetyczne mogą być przeprowadzane na jednym lub większej ilości odpowiednich gatunków i powinny uwzględniać gatunki wykorzystywane lub mające być wykorzystanymi w innych badaniach toksykologicznych z użyciem tej samej substancji testowej. W przypadku wykorzystania gryzoni do badania, różnica wagi nie powinna przekraczać ± 20 % wagi średniej.

Liczba i płeć

Do badań absorpcji i ekskrecji początkowo należy wykorzystać cztery zwierzęta w każdej grupie dawkowania. Zachowanie preferencji w odniesieniu do płci nie jest obowiązkowe, ale w niektórych warunkach obie płcie mogą być wymagane do wykorzystania w badaniach. W przypadku różnic w reakcji danej płci na substancje testową, należy poddać badaniu cztery zwierzęta każdej płci. W przypadku badań na zwierzętach innych niż gryzonie można wykorzystać mniejszą liczbę zwierząt.

W przypadku badania dystrybucji w tkankach należy uwzględnić zarówno liczbę zwierząt w grupie początkowej przeznaczonych do uśmiercenia w każdym punkcie czasowym jak i liczbę punktów czasowych do przebadania.

W przypadku badania metabolizmu wielkość grupy związana jest z potrzebami badań.

W przypadku badań z użyciem wielokrotnego dawkowania i badań z wielokrotnym punktem czasowym, ustalając wielkość grupy należy wziąć pod uwagę liczbę punktów czasowych oraz planowanych uśmierceń, ale nie może składać się z mniej niż dwóch zwierząt. Wielkość grupy powinna być odpowiednia w celu odpowiedniego scharakteryzowania wchłaniania, utrzymywania się i eliminacji testowej substancji i/lub jej metabolitów (stosownie do przypadku).

Poziomy dawek

W przypadku jednorazowego dawkowania należy zastosować co najmniej dwa poziomy dawki. Należy ustalić niski poziom dawki, który nie powoduje obserwowalnych skutków toksyczności i wysoki poziom dawki stosowanie, którego może spowodować zmiany parametrów toksykokinetycznych lub pojawienie się objawów toksyczności.

W przypadku wielokrotnego podawania dawki, niski poziom dawki jest zazwyczaj wystarczający, ale w niektórych okolicznościach konieczne może okazać się stosowanie wysokiego stężenia dawki.

Droga podawania substancji

Badania toksykokinetyczne należy przeprowadzić z użyciem tej samej drogi podawania i, w miarę potrzeb, tego samego nośnika co nośnik użyty lub przeznaczony do życia w innych badaniach toksyczności. Substancja testowa jest zazwyczaj podawana doustnie za pomocą dozownika lub w pożywieniu, nanoszona na skórę lub podawana drogą oddechową przez określone okresy czasu grupom zwierząt badanych. Dożylne podawanie substancji testowej może być korzystne przy ustalaniu względnej absorpcji innymi drogami. Ponadto, mogą zostać dostarczone użyteczne informacje dotyczące wzorów dystrybucji wkrótce po dożylnym podaniu substancji testowej.

Należy uwzględnić możliwość ingerencji nośnika w substancję testową. Należy zwrócić uwagę na różnice w absorpcji związaną z podawaniem substancji testowej przez dozownik oraz podawanie w pożywieniu oraz potrzebę dokładnego określenia dawki w szczególności w przypadku podawania substancji testowej w pożywieniu.

Okres obserwacji

Wszystkie zwierzęta należy obserwować codziennie, a objawy toksyczności oraz inne istotne cechy kliniczne odnotować, włączając porę ich rozpoczęcia, stopień oraz czas trwania.

Procedura

Po przeprowadzeniu ważenia badanych zwierząt, substancja testowa podawana jest właściwą drogą. Jeżeli zostanie uznane za istotne, zwierzętom można wstrzymać podawanie pożywienia przed podaniem substancji testowej.

Absorpcja

Należy oszacować stopień i zakres absorpcji podawanej substancji, wykorzystując różne metody, z użyciem lub bez użycia grup odniesienia ([1]) na przykład przez:

— określenie ilości substancji testowej i/lub metabolitów w wydalinach, takich jak mocz, żółć, kał, wydychane powietrze i tych pozostałych w tuszy,

— porównanie biologicznej reakcji (np. ostra toksyczność badania) między grupą badaną a kontrolną i/lub grupami odniesienia,

— porównanie substancji wydzielanej przez nerki i/lub metabolitu w grupach badanych i grupach odniesienia,

— określenie powierzchni zgodnie z wielkością plazmy/krzywa czasowa substancji testowej i/lub metabolitów oraz porównanie z danymi z grupy odniesienia.

([1]) W tej metodzie grupa odniesienia jest jedyną grupą, której substancję badaną podaje się inną drogą zapewniającą całkowitą biodostępność dawki.

Dystrybucja

Obecnie dostępne są dwa podejścia, jedno lub oba mogą zostać wykorzystane w celu dokonania analizy wzorów dystrybucji:

— uzyskiwane są użyteczne informacje jakościowe, wykorzystując autoradiograficzne techniki badania całego ciała,

— przez uśmiercanie zwierząt w różnych okresach badania po ekspozycji na substancję testową i określeniu stężenia i ilości substancji testowej i/lub metabolitów w tkankach i organach, uzyskiwane są informacje ilościowe.

Wydalanie

W badaniach wydalin należy pobierać mocz, kał i wydychane powietrze oraz, w niektórych sytuacjach, żółć. Należy dokonać kilkukrotnego pomiary ilości substancji testowej i/lub metabolitów w niniejszych wydalinach po ekspozycji na działanie substancji, albo do chwili wydalenia 95 % podanej dawki lub przez okres siedmiu dni, cokolwiek nastąpi jako pierwsze.

W wyjątkowych wypadkach należy uwzględnić wydalanie substancji testowej w mleku u zwierząt w okresie laktacji.

Metabolizm

W celu ustalenia zakresu i modelu metabolizmu należy przeprowadzić analizę biologicznych próbek za pomocą odpowiednich technik. Należy wyjaśnić strukturę metabolitów i właściwe ścieżki metabolizmu w przypadku zaistnienia konieczności udzielenia odpowiedzi na pytania powstałe podczas wcześniejszych badań toksykologicznych. Pomocne może okazać się przeprowadzenie badań *in vitro* w celu uzyskania informacji dotyczących ścieżki metabolizmu.

Dalsze informacje dotyczące powiązań metabolizmu z toksycznością można uzyskać za pomocą badań biochemicznych, takich jak określenie wpływu na metaboliczne szlaki enzymatyczne, wyczerpanie się endogennych, niebiałkowych związków wodorosiarczkowych i wiązanie określonych związków do makromolekuł.

2. DANE

Zgodnie z rodzajem przeprowadzanych badań, dane należy podsumować w formie tabeli popartej prezentacją graficzną, gdzie sytuacja tego wymaga. Dla każdej badanej grupy, w odpowiednich przypadkach, należy wykazać średnie i statystyczne odchylenia pomiarów w związku z czasem, dawkowaniem, tkankami i organami. Zakres absorpcji oraz ilość i normy ekskrecji należy ustalić przy użyciu właściwych metod. W przypadku przeprowadzania badań metabolizmu, należy podać strukturę zidentyfikowanych metabolitów oraz ewentualne ścieżki przedstawionego metabolizmu.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Zgodnie z rodzajem przeprowadzanych badań, sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— gatunek, szczep, źródło, warunki środowiska, pożywienie,

— charakterystyka etykietowanych materiałów, jeżeli zostały użyte,

— wielkości dawkowania oraz stosowane odstępy czasu między dawkowaniem,

— droga(-i) podawania substancji i użyte nośniki,

— toksyczność oraz inne zaobserwowane objawy,

— metody ustalania substancji testowej i/lub metabolitów w biologicznych próbkach, włączając wydychane powietrze,

— przedstawienie pomiarów w formie tabeli w odniesieniu do płci, dawki, reżym dietetyczny, czas, tkanki i organy,

— przedstawienie zakresu absorpcji i ekskrecji w czasie,
— metody związane z charakterystyką i identyfikacją metabolitów w biologicznych próbkach,
— metody pomiarów biochemicznych związanych z metabolizmem,
— proponowane ścieżki metabolizmu,
— analiza wyników,
— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE MUTAGENNOŚCI I BADANIE PRZESIEWOWE NA RAKOTWÓRCZOŚĆ

MUTACJA GENU — *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Odmiana haploidalnych i diploidalnych szczepów bakterii drożdży *Saccharomyces cerevisiae* może zostać użyta w celu dokonania pomiaru produkcji mutacji genu wywołanych czynnikami chemicznymi z udziałem oraz bez aktywacji metabolitycznej.

Używane były wczesne systemy mutacji w szczepach haploidalnych, takie jak pomiar mutacji od czerwonych mutantów wymagających do wzrostu adeniny do białych mutantów z podwójną mutacją adeninową oraz selektywne systemy, takie jak indukcja oporności na kanawainę i cykloheksimid.

Najszerzej uznawany system mutacji wstecznych (rewersji) wymaga użycia haploidalnego szczepu XV 185–14C, posiadający nonsensowną mutację ochre *ade* 2–1, *arg* 4–17, *lys* 1–1 i *trp* 5–48, która może rewertować głównie przez mutacje zastępcze indukujące mutacje specyficzne co do miejsca lub mutacje supresora ochre. XV 185–14C posiada także marker *his* 1–7, niezmysłową mutację, która może rewertować głównie przez mutacje zewnątrz genowe i marker *hom* 3–10 rewertowany przez mutageny powodujące zmianę fazy odczytu.

Wśród diploidalnych szczepów S. *cerevisiae* jedynym szeroko używanym szczepem jest $D_{7,}$ który jest homozygotyczny względem *ilv* 1–92.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Roztwory testowanych substancji chemicznych i próbki kontrolne powinny być przygotowywane tuż przed testem, przy użyciu odpowiednich nośników. W przypadku związków organicznych, które nie są rozpuszczalne w wodzie, należy używać nie więcej niż 2-procentowych (objętościowo) roztworów rozpuszczalników organicznych, takich jak etanol, aceton czy dimetylosulfotlenek (DMSO). Końcowe stężenie nośnika nie powinno znacząco wpływać na żywotność komórek i charakterystykę wzrostu.

Aktywacja metaboliczna

Komórki należy poddać oddziaływaniu testowych substancji chemicznych zarówno w przypadku obecności, jak i braku obecności właściwego egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej.

Najpowszechniej używanym systemem jest współczynnik uzupełniony post-mitochondrialną frakcją z wątrób gryzoni wcześniej przebadanych enzymem wywołującym czynniki. Wykorzystanie innych gatunków, tkanek, post-mitochondrialnych frakcji lub procedur również może być właściwe dla aktywacji matabolicznej.

Warunki badania

Szczepy testowe

Haploidalny szczep XV185–14C i diploidalny szczep D_7 są najczęściej używanymi szczepami w badaniach mutacji genu. Inne szczepy również mogą być właściwe.

Pożywka do hodowli szczepu

Wykorzystuje się właściwe pożywki do hodowli szczepu celem ustalenia liczby komórek, które zachowały żywotność i komórek zmutowanych.

Stosowanie kontroli pozytywnej i negatywnej

Próbki kontrolne pozytywne, niepoddane działaniu substancji i z dodatkiem rozpuszczalnika musza być przygotowane jednocześnie. Odpowiednie substancje do kontroli pozytywnej powinny być użyte na zakończenie każdej mutacji.

Stężenie do celów ekspozycji

Należy użyć co najmniej pięć odpowiednio rozmieszczonych stężeń substancji testowej. W odniesieniu do substancji toksycznych najwyższa wielkość testowego stężenia nie powinna obniżać liczbę komórek, które zachowały żywotność poniżej poziomu 5–10 %. Odpowiednio, należy zbadać substancje rozpuszczalne w wodzie do granicy ich rozpuszczalności, wykorzystując właściwe procedury. W odniesieniu do nietoksycznych substancji łatwo rozpuszczalnych w wodzie, najwyższe stężenie należy ustalić dla każdego przypadku oddzielnie.

Warunki inkubacji

Płytki inkubują się cztery do siedmiu dni w temperaturze 28–30 °C bez dostępu światła.

Częstotliwość mutacji samorzutnej.

Należy użyć subkultury z normalnym zakresem częstotliwości mutacji samorzutnej.

Liczba replikacji

Należy użyć co najmniej trzy szalki replikacji na dane stężenie dla oznaczenia prototrofów produkowanych przez mutację genu i żywotności komórki. W przypadku badań z wykorzystaniem znaczników, takich jak *horn* 3–10 o niskim wskaźniku mutacji, liczba szalek musi zostać powiększona w celu dostarczenia istotnych danych statystycznych.

Procedura

Badanie szczepów *S. cerevisiae* zazwyczaj przeprowadzane jest według procedury badania w środowisku płynnym, włączając albo komórki stacjonarne, albo wzrostowe. Badania wstępne należy przeprowadzić na komórkach wzrostowych: $1–5 \times 10^7$ komórki/ml są poddane ekspozycji na testową substancję chemiczną przez 18 godzin przy temperaturze 28–37 °C ze wstrząsaniem; podczas czynności badawczych, w odpowiednich przypadkach, dodawana jest odpowiednia ilość substancji systemu aktywacji metabolicznej. Na zakończenie badań komórki poddawane są odwirowaniu, oczyszczaniu i umieszczeniu na właściwej pożywce do hodowli szczepu. Po okresie inkubacji płytki poddawane są analizie w celu ustalenia ilości komórek, które zachowały żywotność i komórek wywołujących mutację genu.

Jeżeli pierwsze badanie daje negatywny wynik, następne doświadczenie powinno być przeprowadzane z użyciem komórek znajdujących się w fazie stacjonarnej. Jeżeli pierwsze badanie daje wynik pozytywny, to potwierdzane jest następnym, niezależnym badaniem.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w formie tabeli, wskazując liczbę zliczonych kolonii, liczbę mutantów, liczbę komórek żywych i mutantów. Wszystkie wyniki należy potwierdzić w odpowiednim niezależnym badaniu. Dane należy ocenić za pomocą właściwych metod statystycznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— użyty szczep,

— warunki testu: komórki w fazie stacjonarnej bądź w fazie wzrostu, skład pożywki, temperatura i czas inkubacji, system aktywacji metabolicznej,

— warunki badania: wielkość stężenia substancji podczas ekspozycji na jej działanie, procedura i czas trwania badania, temperatura zastosowana do badania, pozytywne i negatywne kontrole,

— liczba zliczonych kolonii, liczba mutantów, liczba komórek żywych i mutantów, stosunek dawki do reakcji w odpowiednich przypadkach, dane oceny statystycznej,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE REKOMBINACJI GENETYCZNEJ - *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Mitotyczna rekombinacja u *Saccharomyces cerevisiae* może być wykryta między genami (lub ogólnie między genem a jego centromerem) i wewnątrz genów. Ten pierwszy przypadek posiada nazwę „mitotyczne crossing-over" i generuje symetryczny produkt, podczas gdy drugi przypadek najczęściej generuje niesymetryczne produkty i posiada nazwę „konwersja genów". Zajście crossing-over jest widoczne dzięki wytwarzaniu się kolonii homozygot recesywnych lub sektorów wytworzonych w szczepach heterozygotycznych, podczas gdy konwersja genów uwidacznia się przez wytworzenie prototroficznych rewertantów w auksotroficznych, heteroallelicznych szczepach posiadających dwa różne nieprawidłowe allele tego samego genu. Do detekcji mitotycznej konwersji genów najczęściej używa się szczepów D_4 (heteroalleliczny pod względem *ade* 2 i *trp* 5), D_7 (heteroalleliczny pod względem *trp* 5) BZ_{34} (heteroalleliczny pod względem *arg* 4) i JD1 (heteroalleliczny pod względem *his* 4 i *trp* 5). Mitotyczne crossing-over, którego skutkiem jest powstanie czerwonych i różowych sektorów komórek homozygotycznych, może być wykrywane przy użyciu szczepów D_5 lub D_7 (które również wskazują na mitotyczną konwersję genów i wsteczną mutację przy *ilv* 1–92). Obydwa szczepy są heteroalleliczne pod względem odpowiadających sobie alleli *ade 2*.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Roztwory testowych substancji chemicznych i próbki kontrolne powinny być przygotowywane tuż przed badaniem, przy użyciu odpowiednich nośników. W przypadku związków organicznych, które nie są rozpuszczalne w wodzie, należy używać nie więcej niż 2 % (objętościowo) roztworów rozpuszczalników organicznych, takich jak etanol, aceton czy dimetylosulfotlenek (DMSO). Końcowe stężenie nośnika nie powinno w sposób znaczący wpływać na żywotność komórek i charakterystykę wzrostu.

Aktywacja metaboliczna

Komórki należy poddać oddziaływaniu testowych substancji chemicznych zarówno w przypadku obecności, jak i braku obecności właściwego egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej. Najpowszechniej używanym systemem jest współczynnik uzupełniony post-mitochondrialną frakcją z wątrób gryzoni wcześniej przebadanych enzymem wywołującym czynniki. Wykorzystanie innych gatunków, tkanek, post-mitochondrialnych frakcji lub procedur również może być właściwe dla aktywacji metabolicznej.

Warunki badania

Badane szczepy

Najczęściej wykorzystywanymi szczepami są szczepy diploidalne D_4, D_5, D_7 i JD1. Inne szczepy również mogą być właściwe.

Pożywka do hodowli szczepu

Wykorzystuje się właściwe pożywki do hodowli szczepu celem ustalenia liczby komórek pozostałych przy życiu i częstotliwości genetycznych rekombinacji.

Użycie kontroli pozytywnej i negatywnej

Próbki kontrolne pozytywne, niepoddane działaniu substancji i z dodatkiem rozpuszczalnika musza być przygotowane jednocześnie. Odpowiednie substancje do kontroli pozytywnej powinny być użyte na zakończenie każdej mutacji.

Stężenie ekspozycji

Należy użyć co najmniej pięć odpowiednio rozmieszczonych stężeń substancji testowej. Należy uwzględnić, między innymi, takie czynniki jak cytotoksyczność i rozpuszczalność. Najniższe stężenie nie może wpływać na żywotność komórki. w odniesieniu do substancji toksycznych, najwyższa wielkość badanego stężenia nie powinna obniżać liczby komórek, które zachowały żywotność poniżej poziomu 5–10 %. Odpowiednio, należy zbadać substancje rozpuszczalne w wodzie do granicy ich rozpuszczalności, wykorzystując właściwe procedury. W odniesieniu do nietoksycznych substancji łatwo rozpuszczalnych w wodzie, najwyższe stężenie należy ustalić dla każdego przypadku oddzielnie.

Komórki mogą zostać poddane oddziaływaniu substancji testowej albo w fazie stacjonarnej lub podczas wzrastania przez okres do 18 godzin. Jednakże w przypadku długotrwałych badań kultury należy poddać badaniu mikroskopowemu w celu wykrycia formacji zarodnika, którego obecność unieważnia badanie.

Warunki inkubacji

Płytki są inkubowane w ciemności od czterech do siedmiu dni w temperaturze 28–30 °C. Płytki użyte do oznaczenia czerwonych i różowych sektorów homozygot wytworzonych przez mitotyczny crossing-over powinny być przechowywane w lodówce (w temperaturze około 4 °C) przez dalsze 1–2 dni przed oznaczeniem wyników, aby umożliwić rozwój odpowiednich zabarwionych kolonii.

Częstotliwość samorzutnej rekombinacji genetycznej

Należy użyć subkultur z normalnym zakresem częstotliwości samorzutnej rekombinacji genetycznej.

Liczba replikacji

Powinny być użyte co najmniej trzy szalki na określone stężenie, w celu oznaczenia prototrofów wytworzonych za pomocą mitotycznej konwersji genów i w celu oznaczenia żywotności komórek. W przypadku oznaczania recesywnych homozygot wytworzonych przez mitotyczny crossing-over, liczba płytek powinna być zwiększona, aby dostarczyć odpowiednią liczbę kolonii.

Procedura

Badanie szczepów *S. cerevisiae* zazwyczaj przeprowadzane jest według procedury badania w środowisku płynnym, włączając komórki stacjonarne albo wzrostowe. Początkowe badania należy przeprowadzić na komórkach wzrostowych: $1–5 \times 10^7$ komórki/ml są poddane ekspozycji na testową substancję chemiczną przez 18 godzin przy temperaturze 28–37 °C ze wstrząsaniem; w okresie trwania badań, w odpowiednich przypadkach, dodawana jest odpowiednia ilość systemu aktywacji metabolicznej.

Na zakończenie badań, komórki poddawane są odwirowaniu, oczyszczaniu i umieszczane na właściwej pożywce do hodowli szczepu. Po okresie inkubacji, płytki poddawane są analizie w celu ustalenia liczby komórek, które zachowały żywotność i komórek wywołujących mutację genu.

Jeżeli pierwsze badanie daje negatywny wynik, następne doświadczenie powinno być przeprowadzane z użyciem komórek znajdujących się w fazie stacjonarnej. Jeżeli pierwsze badanie daje wynik pozytywny, to potwierdzane jest następnym, niezależnym badaniem.

2. **DANE**

Dane powinny być przedstawione w formie tabeli, która wskazuje liczbę zliczonych kolonii, ilość rekombinantów, liczbę komórek żywych i częstotliwość wystąpienia rekombinacji.

Wyniki powinny być potwierdzone niezależnym badaniem.

Dane powinny być ocenione przy użyciu odpowiednich metod statystycznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— użyty szczep,

— warunki badań: komórki fazy stacjonarnej lub wzrostowej, skład pożywki, temperatura i okres trwania inkubacji, system aktywacji metabolicznej,

— warunki badania: wielkość stężenia substancji, procedura i czas trwania badania, temperatura zastosowana do badania, pozytywne i negatywne grupy kontrolne,

— liczba zliczonych kolonii, liczba rekombinantów, liczba komórek żywych i częstotliwość wystąpienia rekombinacji, stosunek dawki do reakcji, w odpowiednich przypadkach, dane analizy statystycznej,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE MUTACJI KOMÓREK GENÓW SSAKÓW *IN VITRO*

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Systemy kultur komórkowych ssaków mogą być używane do wykrywania mutacji wywoływanych przez substancje chemiczne. Szeroko używane linie komórkowe, w tym L5178Y (komórki mysiej limfomy) oraz linie CHO i V-79 pochodzące od chomika chińskiego. W tych liniach komórkowych najczęściej używane systemy oznaczają mutację loci kinazy tymidynowej (TK), transferazy hipoksantyno-guanino-fosforybozylowej (HPRT) ([1]) i ATPazy Na^+/K^+. Systemy mutacji TK i HPRT wykrywają mutacje jednej pary zasad, mutacje powodujące zmianę ramki odczytu i niewielkie delecje. System Na^+/K^+ pozwala tylko na wykrycie mutacji punktowych.

Komórki z niedoborem kinazy tymidynowej (TK) spowodowanym mutacją $TK^+ - TK^-$, są oporne na bromodeoksyurydynę (BrdU), fluorodeoksyurydynę (FdU) lub trifluorotymidynę (TFT), ponieważ te antymetabolity nie są włączane do nukleotydów komórkowych przez „ratunkowy" system związany z działaniem kinazy tymidynowej; nukleotydy niezbędne do metabolizmu komórkowego uzyskiwane są wyłącznie przez syntezę *de novo*. Jednak w obecności kinazy tymidynowej BrdU, FdU, czy TFT są włączane do nukleotydów, czego skutkiem jest inhibicja metabolizmu komórkowego i cytotoksyczność. Dlatego też zmutowane komórki mogą ulegać proliferacji w obecności BrdU, FdU, czy TFT, podczas gdy normalne komórki, które zawierają kinazę tymidynową nie mogą. Podobnie komórki z niedoborem HPRT są wybierane ze względu na odporność na 8-azoguaninę (AG) lub 6-tioguaninę (TG). Komórki ze zmienioną ATPazą Na^+/K^+ są wybierane ze względu na odporność na strofantynę G.

Cytotoksyczność jest wyznaczana przez pomiary skutków substancji testowanej na zdolność do formowania kolonii lub szybkości wzrostu kultur. Częstotliwość występowania mutacji jest wyznaczana przez posiew znanej liczby komórek w pożywce zawierającej czynniki selekcyjne, w celu wykrycia komórek zmutowanych, i w medium bez czynników selekcyjnych, w celu oznaczenia liczby komórek żywych. Po upływie odpowiedniego czasu inkubacji liczone są kolonie. Częstotliwość występowania mutacji jest obliczana z liczby kolonii zmutowanych, z uwzględnieniem kolonii prawidłowych komórek żywych.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Komórki

Dostępne są odmiany linii komórek w celu użycia w niniejszej próbie. Obejmują one podklony komórek L5178Y, CHO lub komórek V-79 z wykazywaną wrażliwością na substancje mutagenne, wysoką skuteczność klonowania i niską częstotliwość mutacji samorzutnej. Komórki mogą być okresowo kontrolowane pod względem stabilności kariotypu i powinny być kontrolowane pod względem zakażenia mikoplazmami. Można wykorzystać inne rodzaje komórek pod warunkiem, iż ich żywotność w próbach wywoływanej chemicznie mutacji genów może być w pełni udokumentowana.

([1]) Poprzednio HGPRT.

Pożywki do hodowli szczepu

Powinny być stosowane odpowiednie pożywki i warunki inkubacji (np. temperatura, naczynie, stężenie CO_2 oraz wilgotność). Należy dokonać wyboru pożywki oraz serum według wybranych systemów oraz rodzaj komórki do próby.

Substancja testowa

Badane substancje mogą zostać przygotowane na pożywce do hodowli, rozpuszczone lub zawieszone we właściwych nośnikach przed rozpoczęciem badania komórek. Stężenie końcowe nośnika w systemie hodowli nie powinno wpływać na żywotność komórki ani na wskaźnik wzrostu.

Aktywacja metaboliczna

Komórki należy poddać działaniu substancji testowej zarówno w obecności jak i przy braku obecności właściwego egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej ssaków. Ewentualnie, w przypadku użycia rodzaju komórek z wrodzoną aktywacją metaboliczną, wskaźnik charakteru aktywności powinien być znany, aby był właściwy dla badanej klasy chemicznej.

Warunki badania

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Pozytywne grupy kontrolne, używając zarówno bezpośrednio działającego związku, jak i związku wymagającego metabolicznej aktywacji, należy włączyć do każdego badania; należy uwzględnić również negatywną grupę kontrolną z użyciem nośnika.

Poniższe substancje są przykładami substancji, które mogą być użyte jako pozytywne grupy kontrolne:

— bezpośrednio działające związki:

  — etylometanosulfonian,

  — hycanthone,

— pośrednio działające związki:

  — acetyloaminofluoren,

  — 7,12-dimetylobenzantracen,

  — N-nitrozodimetylamina.

W odpowiednich przypadkach można włączyć dodatkową pozytywną grupę kontrolną tej samej klasy chemicznej co substancja chemiczna używana w badaniu.

Stężenie do celów ekspozycji

Należy użyć kilka stężeń substancji testowej. Stężenia te powinny wywołać objawy toksyczności z nimi związane, najwyższe stężenie powoduje niski poziom żywotności komórek pozostałych przy życiu oraz ten sam poziom żywotności komórek przy najniższym stężeniu w przybliżeniu co przy stężeniu użytym w negatywnej grupie.

Odpowiednio, substancje nierozpuszczalne w wodzie należy badać do granicy ich rozpuszczalności wykorzystując właściwe procedury. Dla substancji nietoksycznych łatwo rozpuszczalnych w wodzie, wyższe stężenie substancji testowej należy rozpatrywać dla każdego przypadku oddzielnie.

Procedura

Liczba komórek na jedna kulturę, wykorzystanych w danej kulturze powinna być związana z częstotliwością mutacji samorzutnej; ogólnie należy użyć kilka żywotnych komórek, których liczba stanowić będzie 10-krotną odwrotność częstotliwości mutacji samorzutnej.

Komórki należy poddać działaniu substancji przez określony czas, w większości przypadków właściwe jest od dwóch do pięciu godzin. Komórki nieposiadające odpowiedniej wrodzonej aktywności metabolicznej należy poddać działaniu substancji testowej w obecności i bez obecności właściwego systemu aktywności metabolicznej. Na zakończenie okresu ekspozycji na działanie substancji, komórki są oczyszczane z substancji testowej i hodowane w celu ustalenia żywotności i uwzględnienia ekspresji fenotypu mutanta.

Na zakończenie okresu ekspresji, który powinien być wystarczający celem uzyskania optymalnej ekspresji fenotypowej powstałych mutantów, komórki hodowane są na pożywce z udziałem oraz bez udziału selektywnych czynników w celu ustalenia liczby mutantów i ich żywotności.

Wszelkie wyniki należy potwierdzić niezależnymi badaniami.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w formie tabeli. Należy przedstawić liczbę poszczególnych płytek dla danej substancji testowej i substancji kontrolnych zarówno dla indukcji mutacji, jak i żywotności komórek. Należy podać średnią liczbę kolonii na płytkę oraz odchylenie standardowe. Częstotliwość mutacji należy wyrazić jako liczbę mutantów na liczbę komórek, które zachowały żywotność. Wydajność klonowania i przeżycia wyrażone są jako procent wielkości kontrolnej.

Dane należy ocenić za pomocą właściwych metod statystycznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— użyta linia komórkowa, liczba kultur komórek, metody utrzymywania kultur komórek,

— warunki badań: skład pożywka, stężenie CO_2, stężenie substancji testowej, użyty nośnik, temperatura inkubacji, czas inkubacji, długość okresu ekspresji (włączając liczbę pasażowanych komórek oraz podkultur a także zasady odżywiania, stosownie do potrzeb), czas trwania badania, gęstość komórek podczas badania, rodzaj użytego systemu metabolicznej aktywacji ssaków, pozytywne i negatywne grupy kontrolne, użyty czynnik selektywny,

— racjonalna podstawa wyboru dawki,

— metoda użyta do zliczania żywotnych i zmutowanych komórek,

— analiza statystyczna,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne” część B.

USZKODZENIE I NAPRAWA DNA – NIEREGULARNA SYNTEZA DNA – KOMÓRKI SSAKÓW *IN VITRO*

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Test niezaplanowanej syntezy DNA (UDS) mierzy syntezę DNA po wycięciu i usunięciu odcinka DNA zawierającego obszar uszkodzony przez czynniki chemiczne lub fizyczne. Ten test jest oparty na inkorporacji tymidyny znakowanej trytem (^{3}H-TdR) do DNA komórek ssaków, które nie znajdują się w fazie S cyklu komórkowego. Przyjęcie ^{3}H-TdR może być oznaczone metodą autoradiografii lub zliczania w ciekłym scyntylatorze (LSC) DNA badanych komórek. Komórki ssaków w kulturach, o ile nie są to pierwotne hepatocyty szczura, są poddawane działaniu czynników testowych z obecnością lub bez obecności egzogennych systemów aktywacji metabolicznej. UDS może być także wykonywany w systemach *in vivo*.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Substancje testowe i próbki kontrolne bądź próbki odniesienia powinny być przygotowywane w pożywce wzrostowej, bądź rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich nośnikach, a następnie rozcieńczone w pożywce wzrostowej i użyte do oznaczenia. Końcowe stężenie nośnika nie powinno wpływać na żywotność komórki.

Kultury hepatocytów szczura, ludzkich limfocytów lub ustalonych linii komórkowych (np. ludzkich diploidalnych fibroblastów) mogą być użyte do oznaczeń.

Komórki należy poddać działaniu substancji testowej zarówno w obecności, jak i przy braku obecności właściwego systemu aktywacji metabolicznej.

Warunki badania

Liczba kultur

Konieczne jest wykorzystanie w każdym punkcie badania co najmniej dwóch kultur komórkowych do autoradiografii i sześciu kultur (lub mniej w przypadku naukowego uzasadnienia) dla określenia UDS za pomocą LSC.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Do każdego badania należy włączyć równoległe pozytywne i negatywne grupy kontrolne (niezbadane i/lub którym podawano nośnik) przy obecności, jak i przy braku aktywacji metabolicznej.

Przykładami związków, które mogą być dodawane do próbek kontrolnych pozytywnych, mogą być 7,12-dimetylobenzatracen (7,12-DMBA) lub 2-acetylaminofluoren (2-AAF). W przypadku ustalonych linii komórkowych 4-nitrochinolino-N-tlenek (4-NQO) jest przykładem związku mogącego stanowić pozytywną kontrolę zarówno dla autoradiografii, jak i oznaczeń LSC wykonywanych bez aktywacji metabolicznej komórek; N-dimetylonitrozamina jest przykładem związku dodawanego do próbek kontrolnych, kiedy używane są systemy aktywacji metabolizmu.

Stężenie w celu ekspozycji

Należy użyć wielu stężeń substancji testowej ponad zakres odpowiedni w celu określenia reakcji. Najwyższe stężenia powinny wywołać pewne objawy cytotoksyczności. Odpowiednio, substancje nierozpuszczalne w wodzie należy badać do granicy ich rozpuszczalności. Dla substancji nietoksycznych łatwo rozpuszczalnych w wodzie wyższe stężenie substancji testowej należy rozpatrywać dla każdego przypadku oddzielnie.

Komórki

W celu utrzymania kultury należy zastosować właściwą pożywkę, stężenie CO_2, temperaturę oraz wilgotność. Ustalone linie komórkowe należy okresowo sprawdzać w celu wykrycia skażenia *mikoplazmą*.

Aktywacja metaboliczna

System aktywacji metabolicznej nie jest używany w przypadku pierwotnych kultur hepatocytów. Ustalone linie komórkowe i limfocyty poddane ekspozycji na substancję testową zarówno przy obecności, jak i przy braku odpowiedniego systemu aktywacji metabolizmu.

Procedura

Przygotowanie kultury

Ustalone linie komórkowe są tworzone z kultur zapasowych (np. przez trypsynizację bądź wytrząsanie), pasażowanych w odpowiedniej gęstości do naczyń i inkubowanych w temperaturze 37 °C.

Krótkoterminowe kultury hepatocytów szczura zakładane są przez umożliwienie hepatocytom świeżo rozdzielonym na właściwej pożywce, zagnieżdżenie się na powierzchni wzrostowej.

Kultury ludzkich limfocytów zakładane są za pomocą właściwych technik.

Poddanie kultur ekspozycji na substancję testową

Pierwotne hypocyty szczura

Świeżo izolowane hepatocyty szczura są przez odpowiedni czas poddawane działaniu substancji testowej w pożywce zawierającej ^{3}H-TdR. Pod koniec tego okresu pożywka powinna zostać odsączona, a komórki przepłukane, przygotowane i wysuszone. Szkiełka powinny być zanurzone w emulsji autoradiograficznej (ewentualnie można użyć filmu), naświetlone, wywołane, wybarwione i zliczone.

Ustalone linie komórkowe i limfocytowe

Techniki autoradiograficzne: Kultury komórkowe są poddane ekspozycji na substancję testową przez odpowiedni okres czasu po zastosowaniu ^{3}H-TdR. Czas trwania ekspozycji na działanie substancji zależy od charakteru substancji, aktywności systemów metabolizujących oraz rodzaju komórek. W celu wykrycia szczytu UDS, należy dodać ^{3}H-TdR równocześnie z substancją testową albo w przeciągu kilku minut po ekspozycji na substancje testową. Wybór między tymi dwiema procedurami będzie uwarunkowany ewentualnymi interakcjami między substancją testową a ^{3}H-TdR. Aby odróżnić między UDS i semikonserwatywną replikacją DNA, to ostatnie powinno być zahamowane, na przykład przez użycie pożywki bez zawartości argininy, niewielkiej zawartości surowicy lub przez dodatek hydroksymocznika w pożywce.

Badanie UDS przy pomocy LSC: Przed zastosowaniem substancji testowej powinno zostać zablokowane wejście komórek w fazę S w taki sposób, jak opisano powyżej; komórki powinny być poddawane działaniu substancji testowych tak, jak opisano dla autoradiografii. Po zakończeniu okres inkubacji, DNA należy wydobyć z komórek oraz należy ustalić ogólną zawartość DNA oraz stopień zawartości ^{3}H-TdR.

Należy zauważyć, iż, w przypadku użycia ludzkich limfocytów w powyższych technikach, wymagane jest wyeliminowanie półkonserwatywnej replikacji DNA w niestymulowanych kulturach.

Analiza

Oznaczenia autoradiograficzne

Przy oznaczaniu UDS w komórkach danej kultury jądra znajdujące się w fazie S nie są zliczane. Należy zliczyć co najmniej 50 komórek na skupienie. Szkiełka powinny być opisywane przed zliczaniem. Kilka wyraźnie oddzielonych losowych pól powinno być policzonych na każdym szkiełku. Ilość ^{3}H-TdR wbudowanego w cytoplazmę powinna być oznaczona przez liczenie trzech terenów o kształcie jądra w cytoplazmie każdej ze zliczanych komórek.

Oznaczenie LSC

Oznaczając LSC UDS, należy zastosować odpowiednią liczbę kultur do każdej wielkości stężenia.

Wszystkie wyniki należy potwierdzić niezależnie przeprowadzonym badaniem.

2. DANE

Dane należy przedstawić w formie tabeli.

2.1. Ustalenia autoradiograficzne

Należy oddzielnie odnotować stopień zawartości ^{3}H-TdR w cytoplazmie oraz liczbę ziaren wykrytą w jądrze komórki.

Średnia, mediana i tryb mogą być użyte, aby opisać dystrybucję i stopień wbudowania ^{3}H-TdR do cytoplazmy i liczbę ziaren na jądro.

2.2. Oznaczenie LSC

Dla oznaczenia LSC należy zgłaszać zawartość ^{3}H-TdR jako dpm/µg DNA. Można zastosować średnią dpm/µg DNA z odchyleniem standardowym w celu opisania dystrybucji zawartości.

Dane należy ocenić za pomocą właściwych metod statystycznych.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— zastosowane komórki, gęstość oraz liczba pasaży trakcie badania, liczba kultur komórek,

— metody użyte w celu utrzymania kultury komórek, włączając pożywkę, temperaturę i stężenie CO_2,

— substancja badana, nośnik, stężenia i racjonalna podstawa wyboru wielkości zastosowanych stężeń w próbie,

— szczegóły systemów aktywacji metabolicznej,

— zasady badania,

— pozytywne i negatywne grupy kontrolne,

— zastosowane techniki autoradiograficzne,
— procedury użyte w celu zablokowania wejścia komórek do fazy S,
— procedury zastosowane w celu wydobycia DNA oraz ustalenia ogólnej zawartości DNA w oznaczaniu LSC,
— stosunek dawki do reakcji, jeżeli to możliwe,
— analiza statystyczna,
— analiza wyników,
— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

TEST WYMIANY CHROMATYD SIOSTRZANYCH *IN VITRO*

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Test wymiany chromatyd siostrzanych (SCE) jest krótkoterminowym badaniem mającym na celu wykrywanie wzajemnych wymian DNA między dwoma chromatydami siostrzanymi powielającego się chromosomu. SCE stanowi wymianę produktów replikacji DNA w pozornie homologicznych miejscach. Proces wymiany przypuszczalnie obejmuje rozerwanie i ponowne połączenie DNA, chociaż niewiele poznano na temat jego molekularnej podstawy. Wykrywanie SCE wymaga niektórych sposobów odmiennego etykietowania chromatyd siostrzanych, co można osiągnąć przez włączenie bromodeoksyurydyna (BrdU) do chromosomowego DNA dla dwóch cykli komórkowych.

Komórki ssaków *in vitro* poddane są ekspozycji na substancje testowe z użyciem lub bez użycia egzogennego systemu aktywacji metabolicznej, jeżeli jest to odpowiednia metoda, i hodowane przez okres dwóch cykli replikacyjnych w pożywce zawierającej BrdU. Po dodaniu inhibitora hamującego tworzenie się wrzeciona kariokinetycznego (np. kolchicyny), umożliwiającego nagromadzenie się komórek w stadium mitozy podobnym do metafazy (metafaza c), komórki są zbierane i przygotowywane są preparaty chromosomów.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

— w teście mogą zostać wykorzystane pierwotne kultury (ludzkie limfocyty) lub ustalone linie komórkowe (np. komórki jajnika chińskiego chomika). Linie komórkowe należy sprawdzić na skażenie *mikoplazmą*,

— należy zastosować właściwą pożywkę hodowlaną i warunki inkubacji (np. temperatura, zbiorniki hodowlane, stężenie CO_2 i wilgotność),

— substancje testowe można przygotować na pożywce hodowlanej lub rozpuścić lub zawiesić w odpowiednich nośnikach przed poddaniem badaniu właściwych komórek. Stężenie końcowe nośnika w systemie hodowli nie powinno znacznie wpłynąć na żywotność komórki ani na tempo wzrostu oraz należy monitorować wpływ na częstotliwość SCE przez kontrolę somatyczną,

— komórki należy poddać działaniu substancji testowej zarówno w obecności, jak i braku obecności egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej ssaków. Ewentualnie, w przypadku użycia rodzaju komórek z wrodzonym systemem aktywności metabolicznej, tempo oraz charakter aktywności powinny być właściwe w odniesieniu do badanej klasy chemicznej.

Warunki badania

Liczba kultur

Należy użyć co najmniej podwójne kultury dla każdego punktu badania.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Pozytywne grupy kontrolne, używając zarówno bezpośrednio działającego związku, jak i związku wymagającego metabolicznej aktywacji, należy włączyć do każdego badania; należy uwzględnić również grupę kontrolną, której podawany jest nośnik.

Poniższe substancje są przykładami substancji, które mogą być użyte jako pozytywne grupy kontrolne:

— bezpośrednio działające związki:

  — etylometanosulfonian,

— pośrednio działające związki:

  — cyklofosfamid.

W odpowiednich przypadkach można włączyć dodatkową pozytywną grupę kontrolną tej samej klasy chemicznej co substancja chemiczna używana w badaniu

Stężenia do celów ekspozycji

Należy użyć co najmniej trzy odpowiednio rozmieszczone substancje testowe. Najwyższe stężenie powinno wywołać znaczne objawy toksyczności, ale umożliwiać musi odpowiednią replikację komórki. Odpowiednio, substancje nierozpuszczalne w wodzie należy badać do granicy ich rozpuszczalności, wykorzystując właściwe procedury. Dla substancji nietoksycznych łatwo rozpuszczalnych w wodzie, wyższe stężenie substancji testowej należy rozpatrywać dla każdego przypadku oddzielnie.

Procedura

Przygotowanie hodowli

Ustalone linie komórkowe są tworzone z kultur zapasowych (np. przez trypsynizację lub wytrząsanie), pasażowanych w odpowiedniej gęstości do naczyń i inkubowanych w temperaturze 37 °C. Dla kultur monowarstwowych ilość komórek na naczynie powinna być regulowana w ten sposób, że kultury stanowią niewiele więcej niż 50 % płynu w czasie zbierania komórek. Ewentualnie komórki mogą być użyte w kulturze zawieszonej. Kultury ludzkich limfocytów są zakładane z heparynizowanej krwi z użyciem odpowiednich technik i inkubowane w temperaturze 37 °C.

Poddanie działaniu substancji testowej

Komórki w fazie gwałtownego wzrostu poddawane są ekspozycji na substancję testową przez odpowiedni okres czasu; w większości wypadków wystarczy jedna lub dwie godziny w celu uzyskania pożądanych skutków, ale w niektórych przypadkach czas badania może być przedłużony do dwóch kompletnych cyklów komórkowych. Komórki nie posiadające odpowiedniego wrodzonego systemu aktywności metabolicznej należy poddać działaniu testowej substancji chemicznej w obecności lub braku obecności odpowiedniego systemu aktywności metabolicznej. Po zakończeniu okresu ekspozycji, komórki są oczyszczane z substancji testowej i hodowane przez okres dwóch cykli replikacyjnych w obecności BrdU. Alternatywnie, komórki można poddać procedurze równoczesnej ekspozycji na substancję testową oraz BrdU przez całkowity okres hodowli dwóch cyklów komórkowych.

Kultury ludzkich limfocytów poddane są badaniu w chwili, gdy znajdują się w stadium półsynchronicznym.

Komórki analizowane są podczas ich drugiego podziału, po poddaniu działaniu substancji, co zapewnia, iż najbardziej wrażliwe fazy podziału komórki zostały poddane działaniu testowej substancji chemicznej. Wszystkie kultury, do których dodano BrdU należy utrzymywać w środowisku braku światła lub świetle przyćmionym pochodzącym z żarówek, do chwili zbioru komórek w celu zminimalizowania fotolizy DNA zawierającego BrdU.

Zbieranie komórek

Kultury komórkowe poddawane są działaniu inhibitora (np. kolchiny) na godzinę do czterech godzin przed zbiorem. Każda kultura jest zbierana i przetwarzana oddzielnie w celu przygotowania chromosomów.

Przygotowanie chromosomu i barwienie

Przygotowanie chromosomu dokonywane jest za pomocą standardowych technik cytogenetycznych. Barwienie preparatów w celu wykazania SCE można przeprowadzić za pomocą kilku technik, (np. metoda fluorescencyjna plus Giemsa).

Analiza

Liczba komórek przeznaczonych do analizy powinna być oparta o częstotliwość samorzutnej kontroli SCE. Zazwyczaj co najmniej 25 rozprzestrzeniających się metafaz na kulturę jest analizowanych pod względem SCE. Preparty są oznaczane przed rozpoczęciem analiz. W odniesieniu do ludzkich limfocytów jedynie metafazy zawierające 46 centromerów są poddawane analizie. W ustalonych liniach komórkowych jedynie metafazy zawierające ± 2 centromery liczby modalnej są poddawane analizie. Powinno zostać stwierdzone, czy centromeryczny przełącznik znacznika jest oznaczony jako SCE. Wszystkie wyniki należy potwierdzić niezależnie przeprowadzonym badaniem.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w formie tabeli. Liczba SCE dla każdej metafazy oraz liczba SCE na dany chromosom dla każdej metafazy powinna zostać oddzielnie wyszczególniona dla wszystkich kultur badanych i kontrolnych.

Dane należy oszacować za pomocą odpowiednich metod statystycznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— użyte komórki, metody utrzymywania kultur komórek,

— warunki badań: skład pożywki, stężenie CO_2, stężenie substancji testowej, użyty nośnik, temperatura inkubacji, czas poddania działaniu substancji, użyty inhibitor, jego stężenie oraz czas trwania badania z jego użyciem, rodzaj użytego systemu metabolicznej aktywacji ssaków, pozytywne i negatywne grupy kontrolne,

— liczba kultur komórkowych w danym punkcie badania,

— szczegóły dotyczące techniki zastosowanej w celu przygotowania preparatu,

— liczba metafaz poddanych analizie (dane przedstawione oddzielnie dla każdej kultury),

— średnia liczba SCE w danej komórce i w danym chromosomie (dane przedstawione oddzielnie dla każdej kultury),

— kryteria obliczania SCE,

— racjonalna podstawa wyboru dawki,

— stosunek dawki do reakcji, w odpowiednich przypadkach,

— statystyczna analiza,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIA SPRZĘŻONYCH Z PŁCIĄ RECESYWNYCH CECH LETALNYCH U *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Badanie sprzężonych z płcią recesywnych cech letalnych (SLRL) u *Drosopbila melanogaster* wykrywa istnienie mutacji, zarówno punktowych, jak i niewielkich delecji, w linii zarodkowej owada. Niniejsze badanie jest poprzedzone testem mutacji zdolnym zbadać około 800 miejsc na chromosomie X; stanowi to około 80 % wszystkich miejsc chromosomu X. Chromosom X stanowi około jednej piątej całego genomu haploidalnego.

Mutacje w chromosomie X u *Drosophila melanogaster* fenotypowo ujawniają się u samców przenoszących gen mutujący. Kiedy mutacja jest letalna u homozygot, jej obecność można wnioskować na podstawie nieobecności jednej klasy męskiego potomstwa, podczas gdy heterozygotyczne samice normalnie wydają dwa rodzaje męskiego potomstwa. Badanie SLRL wykorzystuje te aspekty za pomocą specjalnie oznaczonych i ułożonych chromosomów.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Zasoby

Samce pochodzące z dobrze zdefiniowanych zasobów dzikiego typu i samice z zasobu Muller-5 mogą być używane. Inne odpowiednio oznaczone samice z wielokrotną inwersją chromosomu X także mogą być używane.

Substancja testowa

Substancje testowe powinny być rozpuszczone w wodzie. Substancje nierozpuszczalne w wodzie mogą być rozpuszczone lub zawieszone w odpowiednich nośnikach (np. mieszaninie etanolu i Tween-60 lub 80) i rozcieńczone w wodzie lub roztworze soli przed podaniem. Dimetylosulfoksyd nie powinien być używany jako nośnik.

Liczba zwierząt

Test powinien być zaprojektowany z ustalonymi z góry czułością i siłą. Częstotliwość samorzutnej mutacji obserwowana w odpowiedniej grupie kontrolnej w dużym stopniu wpłynie na liczbę badanych chromosomów, które należy poddać analizie.

Droga podawania substancji testowej

Poddanie działaniu substancji może odbywać się drogą pokarmową, przez wstrzyknięcie lub przez ekspozycję na gazy lub opary. Substancja testowa może być podawana w roztworze cukru. W przypadku gdy zaistnieje taka konieczność, substancje mogą zostać rozpuszczone w 0,7 % roztworze NaCl oraz wstrzyknięte do klatki piersiowej lub brzucha.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Należy rozważyć użycie negatywnych (użycie nośnika) i pozytywnych grup kontrolnych. Jednakże w przypadku dostępności do odpowiednich laboratoryjnych danych bazowych, nie jest wymagane wprowadzenie równoczesnych grup kontrolnych.

Poziomy dawek

Należy zastosować trzy poziomy dawek. W celu dokonania wstępnej analizy można zastosować jeden poziom dawki substancji testowej, której wielkość będzie oscylować na minimalnym tolerowanym poziomie stężenia lub poziomie stężenia wywołującym pewne objawów i toksyczności. Odnośnie substancji nietoksycznych należy użyć maksymalną stosowaną wielkość stężenia substancji testowej.

Procedura

Dzikie samce (trzy lub pięciodniowe) poddawane są działaniu substancji testowej oraz indywidualnie używane do krycia dziewiczych samic pochodzących z zasobu Muller-5 lub innego właściwie oznaczonego zasobu (z wielokrotnymi odwróconymi chromosomami X). Samice zastępowane są nowymi dziewiczymi samicami co dwa lub trzy dni, w celu objęcia całego cyklu komórek zarodkowych. Potomstwo tych samic jest analizowane pod względem wystąpienia skutków śmiertelności odpowiadających wpływowi na dojrzałe plemniki, spermatydy średniego i późnego stadium, spermatydy wczesnego stadium, spermatocyty i spermatogonia w czasie poddania działaniu.

Heterozygotyczne samice F_1 pochodzące z powyższych krzyżówek kryte są indywidualnie (tj. jedna samica na fiolkę) ich braćmi. W pokoleniu F_2, każda kultura liczona jest pod względem braku dzikich samców. Jeżeli okaże się, iż kultura powstała od samic F_1 przenoszących cechę śmiertelności w rodzicielskim chromosomie X (tj. nie zaobserwowano żadnych samców z badanym chromosomem), córki takich samic z tym samym genotypem należy zbadać w celu ustalenia, iż cecha śmiertelności jest powtarzana w następnym pokoleniu.

2. DANE

Dane należy przedstawić w formie tabeli w celu wykazania liczby zbadanych chromosomów X, liczby niepłodnych samców oraz liczby chromosomów z cechą letalną przy każdej wielkości stężenia oraz w każdym okresie krycia dla każdego samca poddanego działaniu substancji testowej. Należy odnotować liczbę klastrów różnego rozmiaru na danego samca. Niniejsze wyniki powinny zostać potwierdzone oddzielnym badaniem.

Odpowiednie metody statystyczne powinny być użyte w ocenie cech letalnych sprzężonych z płcią. Skupianie się recesywnych cech letalnych pochodzących od jednego samca powinno być wzięte pod uwagę i przeanalizowane przy pomocy odpowiedniej metody statystycznej.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— zasoby: zastosowane zasoby lub szczepy *Drosophila*, wiek owadów, liczba samców poddanych badaniu, liczba bezpłodnych samców, liczba ustalonych kultur F_2, liczba kultur F_2 bez potomstwa, liczba chromosomów przenoszących cechę letalną, wykrytą w każdej fazie komórki zarodkowej,

— kryteria dla określenia wielkości badanych grup,

— warunki badania: szczegółowy opis badania i zasada pobierania próbek, poziomy ekspozycji, dane dotyczące toksyczności, negatywne (rozpuszczalnik) i pozytywne grupy kontrolne, odpowiednio do potrzeb,

— kryteria służące ocenie mutacji letalnych,

— zależność między objawami a poziomem ekspozycji, jeżeli to możliwe,

— dane dotyczące analizy,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. Analiza i interpretacja

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. ODNIESIENIA

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE PRZEMIANY KOMÓRKOWEJ SSAKÓW *IN VITRO*

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Systemy hodowli komórkowej ssaków mogą być zastosowane w celu wykrycia zmian fenotypowych *in vitro* wywołanych substancjami chemicznymi związanymi ze złośliwymi przemianami *in vivo*. Powszechnie używane komórki, takie jak C3H10T½, 3T3, SHE, szczura Fischera i testowe polegają na ocenie zmian w morfologii komórki, formowania skupisk, czy zależności od zakotwiczenia w półstałym agarze. Istnieją systemy rzadziej stosowane, które pozwalają wykryć inne zmiany fizjologiczne lub morfologiczne w komórkach w następstwie ekspozycji na substancję rakotwórczą. Żadne testy końcowe badania *in vitro* nie mają ustalonego bezpośredniego powiązania z nowotworem. Niektóre systemy badawcze są w stanie wykryć aktywatory guzów. Cytototoksyczność można ustalić przez określenie wpływu badanego materiału na zdolności formowania kolonii (wydajność klonowania) lub wskaźniki wzrostu kultury. Pomiar cytotoksyczności ma na celu ustalenie, że ekspozycja na działanie substancji testowej jest istotna pod względem toksykologicznym, ale nie może być wykorzystywana w celu obliczenia częstotliwości przemian we wszystkich próbach, ponieważ niektóre mogą obejmować długotrwałą inkubację i/lub pasażowanie.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Komórki

W zależności od stosowanego badania przemian, dostępne są różne linie komórkowe lub komórki podstawowe. Badacz musi zapewnić, iż komórki wykorzystywane w przeprowadzanym badaniu wykazują właściwe zmiany fenotypowe w następstwie poddania działaniu znanym czynnikom rakotwórczym oraz że badanie, przeprowadzane w laboratorium badacza, jest potwierdzone i posiada udokumentowaną wiarygodność.

Pożywka kultur

Należy zastosować pożywkę oraz warunki doświadczalne właściwe dla prób przemiany komórkowej.

Substancja testowa

Substancja testowa może zostać przygotowana na pożywce hodowlanej lub rozpuszczona lub zawieszona we właściwych nośnikach przed rozpoczęciem badania komórek. Stężenie końcowe nośnika w systemie hodowli nie powinno wpływać na żywotność komórki, tempo wzrostu ani na częstotliwość przemian.

Aktywacja metaboliczna

Komórki należy poddać działaniu substancji testowej zarówno w obecności, jak i przy braku obecności właściwego systemu aktywacji metabolicznej. Ewentualnie w przypadku użycia rodzaju komórek z wrodzoną aktywacją metaboliczną wskaźnik charakteru aktywności powinien być znany, aby był właściwy dla badanej klasy chemicznej.

Warunki badania

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Pozytywne grupy kontrolne, używając zarówno bezpośrednio działającego związku, jak i związku wymagającego metabolicznej aktywacji, należy włączyć do każdego badania; należy uwzględnić również negatywną grupę kontrolną, której podawany jest nośnik.

Poniższe substancje są przykładami substancji, które mogą być użyte jako pozytywne grupy kontrolne:

— związki działające bezpośrednio:

  — etylometanosulfonian,

  — β-propiolakton,

— związki wymagające aktywacji metabolicznej:

  — 2-acetylaminofluoren,

  — 4-dimetyloaminoazobenzen,

  — 7,12-dimetylobenzantracen.

W odpowiednich przypadkach można włączyć dodatkową pozytywną grupę kontrolną tej samej klasy chemicznej, co związek używany w badaniu.

Stężenia oddziałującej substancji

Należy użyć kilka stężeń substancji testowej. Niniejsze stężenia powinny wywołać objawy toksyczności z nimi związane, przy najwyższym stężeniu powodować niski poziom komórek pozostałych przy życiu oraz poziom żywotności komórek przy najniższym stężeniu, oscylujący w przybliżeniu na tym samym poziomie, co przy stężeniu użytym w negatywnej grupie kontrolnej. Odpowiednio, substancje nierozpuszczalne w wodzie należy badać do granicy ich rozpuszczalności, wykorzystując właściwe procedury. Dla substancji nietoksycznych łatwo rozpuszczalnych w wodzie, wyższe stężenie substancji testowej należy rozpatrywać dla każdego przypadku oddzielnie.

Procedura

Komórki należy poddać działaniu substancji przez określony okres czasu, w zależności od stosowanego systemu badań, może to dotyczyć ponownego dawkowania wraz ze zmianą pożywki do hodowli (i w miarę potrzeby, świeżą mieszaninę aktywacji metabolicznej) w przypadku długotrwałej ekspozycji na działanie substancji testowej. Komórki nieposiadające odpowiedniej wrodzonej aktywności metabolicznej należy poddać ekspozycji na substancję testową w obecności i bez obecności właściwego systemu aktywności metabolicznej. Pod koniec okresu ekspozycji komórki są przepłukiwane w celu usunięcia substancji testowej i hodowane w warunkach odpowiednich dla monitorowania momentu pojawienia się zmienionego fenotypu i zasięgu transformacji. Wszelkie wyniki potwierdzane są niezależnym badaniem.

2. DANE

Dane powinny być opracowane w formie tabeli i mogą wymagać uwzględnienia różnorodności form zgodnie z metodą oznaczenia, która została użyta, np. zliczanie płytek, płytki pozytywne bądź ilość stransformowanych komórek. Jeżeli jest to odpowiednia metoda, ilość komórek, które przeżyły powinna być wyrażona jako procent poziomu kontroli i częstotliwości występowania ekspresji wyrażonej jako stosunek ilości komórek stransformowanych do komórek, które przeżyły ekspozycję. Dane należy przeanalizować za pomocą właściwych metod statystycznych.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— rodzaj użytej komórki, liczba kultur komórkowych, metody utrzymania kultur komórkowych,

— warunki badania: stężenie substancji, użyty nośnik, czas inkubacji, czas trwania oraz częstotliwość badania, gęstość komórkowa podczas badania, rodzaj użytego egzogenicznego systemu aktywacji metabolicznej, pozytywne i negatywne grupy kontrolne, specyfikacja kontrolowanego fenotypu, zastosowany system wyboru (odpowiednio do potrzeb), racjonalna podstawa wyboru dawkowania,

— metody stosowane do liczenia żywych i zmienionych komórek,
— statystyczna analiza,
— analiza wyników,
— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

BADANIE DOMINUJĄCEGO GENU LETALNEGO GRYZONIA

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Dominujące cechy letalne powodują śmierć embrionu lub płodu. Indukcja dominujących cech letalnych przez ekspozycję na substancję chemiczną wskazuje na fakt, iż substancja zaatakowała tkankę zarodkową badanego gatunku. Ogólnie przyjmuje się, iż dominujące cechy letalne spowodowane są uszkodzeniami chromosomowymi (nieprawidłowości strukturalne i liczbowe). Śmierć zarodkowa, w przypadku badania samic, może również wynikać ze skutków toksyczności.

Ogólnie, samce poddawane są działaniu badanego związku oraz wykorzystywane do krycia niebadanych dziewiczych samic. Różne fazy komórki zarodkowej można poddać oddzielnym badaniom przez zastosowanie sekwencyjnego krycia w odpowiednich odstępach czasu. Wzrost liczby martwych implantów na samicę w grupie badanej ponad liczbę martwych implantów na samicę w grupie kontrolnej odzwierciedlają straty poimplantacyjne. Straty przedimplantacyjne można ocenić w oparciu o liczbę *ciałek żółtych* lub przez porównanie całkowitej ilości implantów danej samicy w grupie badanej i grupach kontrolnych. Całkowity efekt dominujących cech letalnych jest sumą przedimplantacyjnych i poimplantacyjnych strat. Obliczenie całkowitego skutku dominujących cech letalnych jest oparte na porównaniu żywych implantów danej samicy w grupie badanej do żywych implantów danej samicy w grupie kontrolnej. Zmniejszanie się ilości implantów w pewnych odstępach czasu może być skutkiem uśmiercania komórek (tj. spermatocytów i/lub spermatogoniów)

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Jeżeli to możliwe, substancje testowe należy rozpuścić lub zawiesić w izotonicznym roztworze soli. Substancje chemiczne nierozpuszczalne w wodzie mogą być rozpuszczone lub zawieszone we właściwych nośnikach. Użyty nośnik nie powinien ani kolidować z testową substancją chemiczną, ani powodować jakichkolwiek objawów toksyczności. Należy zastosować świeże preparaty testowej substancji chemicznej.

Warunki badania

Droga podawania

Testowy związek chemiczny ogólnie należy podać tylko raz. W oparciu o informacje badań toksykologicznych można zastosować powtórzony harmonogram badań. Zwyczajowymi drogami podawania substancji testowej jest intubacja drogą pokarmową lub przez iniekcję dootrzewnową. Inne drogi podawania substancji również mogą być właściwe.

Zwierzęta badane

Gatunkami zalecanymi do wykorzystania w badaniu są szczury i myszy. Zdrowe, w pełni dojrzałe zwierzęta są losowo przydzielane do grupy badanej i grup kontrolnych.

Liczba i płeć

Należy wykorzystać odpowiednią liczbę samców, uwzględniając samoczynne zmiany cech biologicznych. Wybrana ilość powinna być oparta na wcześniej oznaczonej czułości detekcji i sile znaczenia. Na przykład, w typowym badaniu liczba samców w każdej grupie dawkowania powinna być wystarczająca, aby zapewnić 30–50 ciężarnych samic w danym okresie krycia.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Ogólnie, do każdego badania należy włączyć równoległe negatywne i pozytywne grupy kontrolne (dawkowanie z użyciem nośnika). W przypadku dostępności wyników pozytywnej grupy kontrolnej z badań ostatnio przeprowadzanych w tym samym laboratorium, niniejsze wyniki można zastosować zamiast równoległej pozytywnej grupy kontrolnej. Należy użyć pozytywnych substancji kontrolnych przy odpowiednio niskiej dawce (np. MMS, dootrzewnowo, przy 10 mg/kilogram) w celu wykazania czułości badania.

Poziomy dawek

Zwyczajowo należy zastosować trzy poziomy dawek. Najwyższa wielkość dawki powinna powodować objawów i toksyczności lub obniżoną płodność u badanych zwierząt. W niektórych przypadkach, jednorazowe dawkowanie może okazać się wystarczające.

Test graniczny

Substancje nie toksyczne należy testować przy 5 g/kilogram przy jednorazowym podaniu dawki lub przy 1 g/kilogram/dzień przy powtarzalnym podawaniu dawki.

Procedura

Dostępne jest kilka harmonogramów badania. Najszerzej stosowane jest jednorazowe podawanie substancji testowej. Można stosować inne odpowiednie harmonogramy badań.

Poszczególne samce wykorzystywane są do krycia jednej lub dwóch niebadanych, dziewiczych samic sekwencyjnie w odpowiednich odstępach czasu po poddaniu działaniu substancji. Samice należy pozostawić w obecności samca co najmniej przez czas trwania jednego cyklu rujowego lub do czasu wystąpienia krycia ustalonego przez obecność spermy w pochwie lub obecność czopu nasienia w pochwie.

Liczba kryć następujących po zakończeniu badania jest regulowana harmonogramem badania i należy zapewnić, iż zostaną pobrane próbki wszystkich faz komórki zarodkowej po zakończeniu badania.

Samice uśmiercane są w drugiej połowie okresu ciąży, a zawartość macicy poddawana jest badaniu w celu ustalenia liczby żywych oraz martwych implantów. Można przeprowadzić badanie jajników w celu ustalenia liczby *ciałek żółtych*.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w formie tabeli, wskazując liczbę samców, liczbę ciężarnych samic, oraz liczbę nieciężarnych samic. Wyniki krycia, włączając identyfikację każdego samca i samicy, należy odnotować indywidualnie. W odniesieniu do każdej samicy należy odnotować tydzień, w którym nastąpiło krycie, wielkość dawki otrzymanej przez samca, oraz ilość martwych i żywych implantów.

Obliczenie całkowitego skutku dominujących cech letalnych jest oparte na porównaniu żywych implantów przypadających na samicę w grupie badanej do żywych implantów przypadających na samicę w grupie kontrolnej. Stosunek martwych implantów do żywych implantów w grupie badanej w porównaniu do tego samego stosunku w grupie kontrolnej jest analizowany w celu wykazania strat poimplantacyjnych.

Jeżeli dane odnotowane są jako zgony wczesne i późne, należy ten fakt jasno sprecyzować w tabeli. Jeżeli dokonywana jest ocena strat przedimplantacyjnych, taki fakt należy odnotować. Straty przedimplantacyjne można obliczyć jako różnicę między liczbą *ciałek żółtych* oraz liczbą implantów lub jako obniżenie średniej liczby implantów na daną macicę w porównaniu z kryciami kontrolnymi.

Dane szacowane są z wykorzystaniem odpowiednich metod statystycznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— gatunki, szczep, wiek i waga badanych zwierząt, liczba zwierząt każdej płci w grupie badanej i grupach kontrolnych,

— substancja testowa, nośnik, badane poziomy dawek oraz racjonalna podstawa wyboru dawki, negatywne i pozytywne grupy kontrolne, dane dotyczące toksyczności,

— droga oraz harmonogram badań,

— harmonogram krycia,

— metody stosowane w celu ustalenia zaistnienia krycia,

— czas uśmiercenia zwierząt,

— kryteria, według których oznaczane są dominujące cechy letalne,

— związek wysokości dawkowania z reakcją, w odpowiednich przypadkach,

— analiza statystyczna,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

CYTOGENETYKA KOMÓRKI ZARODKOWEJ SSAKÓW *IN VIVO*

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Niniejsze badanie cytogenetyczne *in vivo* wykrywa strukturalne uszkodzenia chromosomowe w spermatogoniach. Badanie obejmuje analizę mitozy spermatogoniów w zakresie uszkodzeń chromatydowych i chromosomowych.

Metoda stosuje preparaty jąder ssaków, które zostały poddane ekspozycji na chemiczną substancję testową odpowiednimi drogami, a następnie uśmiercone w różnych odstępach czasu. Następnie przed uśmierceniem zwierzęta poddawane są badaniu inhibitorami, takimi jak kolchicyna, dotyczącemu nagromadzenia komórek w metafazalnej fazie mitozy (metafaza c). Sporządzane są preparaty chromosomowe, które są osuszane, barwione i poddawane analizie mikroskopowej.

Analiza spermatocytów w stadium diakinezy metafazy I pod względem translokacji po ekspozycji komórek macierzystych spermatogoniów może dostarczyć pożytecznych dodatkowych informacji.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Testowe substancje chemiczne są rozpuszczane w izotonicznym roztworze soli. Substancje chemiczne nierozpuszczalne w wodzie mogą być rozpuszczone lub zawieszone we właściwych nośnikach. Stosuje się świeżo przygotowane roztwory badanego związku. W przypadku zastosowania nośnika w celu usprawnienia dawkowania, nie może on kolidować z testową substancją chemiczną ani powodować jakichkolwiek objawów toksyczności.

Droga podawania

Testowy związek chemiczny ogólnie należy podać tylko raz. W oparciu o informacje badań toksykologicznych można zastosować powtórzony harmonogram badań. Jednakże można powtórzyć badanie jedynie w przypadku gdy związek testowy nie wykazuje objawów cytotoksyczności w różniących się spermatogoniach.

Zwyczajowymi drogami podawania substancji testowej jest intubacja drogą pokarmową lub przez iniekcję dootrzewnową. Inne drogi podawania substancji również mogą być właściwe.

Zwierzęta badane

Najczęściej wykorzystywane zwierzęta to myszy i chomiki chińskie. Do badania można wykorzystać wszelkie inne gatunki ssaków.

Wykorzystuje się osobniki płciowo dojrzałe, które losowo przydziela się do grupy badanej i grup kontrolnych.

Liczba zwierząt

Należy użyć co najmniej pięć samców w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Do każdego badania należy włączyć równoczesne pozytywne i negatywne (użycie nośnika) grupy kontrolne.

Należy użyć pozytywne substancje kontrolne o odpowiednio niskiej wielkości dawki (np. mitomicyna C, dootrzewnowo, przy 0,3 mg/kilogram) w celu wykazania czułości badania.

Wielkość dawki

Wykorzystywana jest jedna dawka badanego związku, dawka posiadająca maksymalną tolerancję lub dawka wywołująca pewne objawów i cytotoksyczności. W przypadku gdy niniejsza dawka wywołuje wysoką śmiertelność komórki, wówczas należy zastosować dodatkową niższą wielkość dawki wykazującej cytotoksyczność. W przypadku gdy konieczne okaże się ustalenie związku między wielkością dawki a reakcją, wymagane są co najmniej trzy poziomy dawek (np. w celu potwierdzenia słabej pozytywnej reakcji). Substancje nietoksyczne należy zbadać z użyciem najwyższej stosowanej wielkości dawki zarówno przy jednorazowym, jak i wielokrotnym dawkowaniu.

Procedura

Ogólnie zwierzęta poddawane są działaniu związku testowego tylko raz. W grupie najwyższego dawkowania stosuje się trzy okresy pobierania próbek po poddaniu działaniu związku testowego. Środkowy okres pobierania próbek trwa 24 godziny. Ponieważ badany związek może wpłynąć na kinetykę cyklu komórkowego, stosuje się jeden wcześniejszy i jeden późniejszy okres pobierania próbek odpowiednio rozmieszczone w przedziale 6–48 godzin. W odniesieniu do dodatkowych poziomów dawek, próbki należy pobierać w szczególnie czułych okresach, lub, jeżeli niniejsze nie są znane, 24 godziny po poddaniu działaniu związku testowego.

Ewentualnie można zastosować powtórzony harmonogram badań, a zwierzęta należy uśmiercić 24 godziny po ostatniej ekspozycji na związek testowy. Można zastosować dodatkowe okresy pobierania próbek w przedziale 6–24 godzin.

Przygotowanie jądra

W celu dokonania analizy mitozy zachodzącej w spermatogoniach, zwierzętom wstrzykuje się dootrzewnowo odpowiednią dawkę inhibitora, takiego jak kolchina. Zwierzęta uśmiercane są w odpowiednich odstępach czasu po przeprowadzeniu powyższej procedury. W odniesieniu do myszy, te odstępy czasu różnią się od trzech do pięciu godzin, w odniesieniu do chomików chińskich wymagany jest odstęp czasu większy niż pięć godzin.

Stosowana jest technika suszenia powietrzem. Inne gatunki mogą wymagać zmiany procedury standardowej. Uzyskiwane są zawiesiny komórkowe, które następnie poddawane są działaniu roztworu hipotonicznego i nielotnego. Komórki rozdzielane są na preparaty i następnie barwione. Preparaty oznacza się przed rozpoczęciem analizy mikroskopowej.

Analiza

Co najmniej 100 odpowiednio rozdzielonych metafaz mitotycznych z kompletną liczbą centromerów poddawane jest analizie w celu wykrycia strukturalnych uszkodzeń chromosomowych. Ponadto, ustalić można stosunek mitozy zachodzącej w spermatogoniach do pierwszych i drugich metafaz mejotycznych w ogólnej liczbie 100 dzielących się komórek na dane zwierzę w celu określenia ewentualnych skutków cytotoksyczności.

2. **DANE**

Dane należy przedstawić w formie tabeli. W odniesieniu do wszystkich zwierząt grupy kontrolnej i badanej, każdy rodzaj uszkodzenia należy wymienić osobno. Należy podać całkowitą liczbę komórek poddanych analizie i całkowitą liczbę uszkodzonych komórek w danej grupie. Należy podać średnią oraz odchylenie standardowe dla wszystkich parametrów. Po ustaleniu, należy przedstawić średni stosunek mitoz zachodzących w spermatogoniach do pierwszych i drugich metafaz mejotycznych dla każdej grupy badanej i kontrolnej.

Dane zostają oszacowane z wykorzystaniem odpowiednich metod statystycznych.

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— gatunek i szczep samców, wiek i waga samców,
— liczba zwierząt w każdej grupie badanej i kontrolnej,
— warunki badania, szczegółowy opis badania, poziomy dawek, rozpuszczalniki, użyty inhibitor,
— liczba komórek poddanych analizie na liczbę zwierząt w grupie,
— dla każdego zwierzęcia grupy badanej i kontrolnej: rodzaj oraz liczba uszkodzeń,
— statystyczna analiza,
— analiza wyników,
— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

TEST PLAMKOWY U MYSZY

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. **Definicje**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. **Substancje odniesienia**

Brak.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Niniejszy test jest testem *in vivo* u myszy, u których rozwijające się zarodki eksponowane są na działanie substancji chemicznych. Komórkami docelowymi u rozwijających się zarodków są melanoblasty, a docelowe geny są genami, które kontrolują pigmentację sierści. Rozwijające się zarodki są heterozygotyczne dla wielu takich genów odpowiedzialnych za kolor sierści. Mutacja wewnątrz lub strata (przez różnorodne procesy) allelu dominującego takiego genu w melanoblaście prowadzi do ekspresji fenotypu recesywnego w komórkach potomnych, ujawniając się w postaci plamki o zmienionym kolorze na futrze myszy. Liczona jest liczba potomstwa z takimi plamkami, mutacjami, a ich częstotliwość porównywana jest z potomstwem wywodzącym się od zarodków poddanych jedynie działaniu rozpuszczalnika. Test plamkowy u myszy wykrywa domniemane somatyczne mutacje w komórkach płodów.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Brak.

1.6. **Opis metody badawczej**

Przygotowania

Jeżeli to możliwe, substancje testowe rozpuszczane są lub zawieszane w izotonicznym roztworze soli. Substancje chemiczne nierozpuszczalne w wodzie są rozpuszczane lub zawieszane we właściwych nośnikach. Zastosowany nośnik nie powinien ani kolidować z testową substancją chemiczną, ani powodować jakichkolwiek objawów toksyczności. Należy zastosować świeże preparaty testowej substancji chemicznej.

Zwierzęta badane

Myszy szczepu T (nie-agouti, a/a; szynszyla, różowe oczy, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brązowe, b/b; jaśniejsze, o krótkich uszach, d se/d se; łaciate, s/s) są krzyżowane zarówno ze szczepem HT (jasne, nie-agouti, brachypodia, pa a bp/pa a bp; grafitowe kędzierzawe ln fz/ln fz; perłowe pe/pe), jak i ze szczepem C57 BL (nie-agouti, a/a). Inne właściwie krzyżówki, takie jak między NMRI (nie-agouti, a/a; albinos, c/c) a DBA (nie-agouti, a/a; brązowe, b/b; jaśniejsze d/d) mogą być stosowane pod warunkiem że ich potomstwo będzie typu nie-agouti.

Liczba i płeć

Odpowiednia liczna ciężarnych samic poddana jest badaniu w celu uzyskania właściwej liczby żywego potomstwa w odniesieniu do każdego poziomu użytej dawki. Właściwy rozmiar próbki jest regulowany liczbą plamek zaobserwowanych u badanych myszy oraz skalą danych kontrolnych. Negatywny wynik akceptowany jest jedynie wtedy, gdy w wynikach uwzględniono co najmniej 300 osobników potomstwa pochodzących od samic poddanych działaniu substancji testowej o najwyższej wielkości dawki.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Powinny zostać udostępnione dane z równoległej grupy kontrolnej w odniesieniu do myszy poddanych jedynie działaniu nośnika (negatywne grupy kontrolne). Dane bazowe grup kontrolnych pochodzące z tego samego laboratorium mogą zostać włączone w celu podniesienia czułości testu pod warunkiem, iż są one jednorodne. Należy udostępnić dane z pozytywnej grupy kontrolnej ostatnio uzyskane w tym samym laboratorium w związku z poddaniem działaniu substancji chemicznej, o której wiadomo, iż wywołuje objawy mutagenicznności, w przypadku braku wykrycia mutagenicznności związanej z działaniem testowej substancji chemicznej.

Droga podawania substancji

Zwyczajowe drogi podawania substancji to intubacja drogą pokarmową lub przez iniekcję dootrzewnową stosowane u ciężarnych samic. W odpowiednich przypadkach stosuje się podawanie substancji przez drogi inhalacyjne lub inne drogi podawania substancji testowej.

Poziomy dawek

Stosuje się co najmniej dwa poziomy dawek, włączając jeden skutkujący objawami toksyczności lub obniżoną wielkością miotu. W przypadku nietoksycznych substancji chemicznych, należy zastosować ekspozycję na maksymalny stosowany poziom dawki.

Procedura

Poddanie działaniu dawki jednorazowej, zazwyczaj stosowane jest w 8, 9 lub 10 dniu ciąży, licząc dzień 1 jako dzień, w którym po raz pierwszy zaobserwowano czop nasienia w pochwie. Dni te odpowiadają 7, 25, 8, 25 i 9, 25 dniom po poczęciu. Po tym okresie można zastosować kolejne podanie dawki.

Analiza

Potomstwo jest oznaczane oraz liczone pod względem plamek między trzecim i czwartym tygodniem po urodzeniu. Wyróżnia się trzy klasy plamek:

a) białe plamki do 5 mm linii środkowobrzusznej, które przypuszczalnie powodowane są uśmiercaniem komórek (WMVS);

b) żółte, podobne do agouti, cętka występujące na sutku, genitaliach, gardle, w okolicach pach i pachwin oraz w okolicach środka czoła, które przypuszczalnie są wynikiem braku różnicowania (MDS); oraz

c) zabarwione oraz białe plamki losowo rozmieszczone na sierści które przypuszczalnie wywodzą się z mutacji somatycznych (RS).

Wszystkie trzy klasy są odnotowane jako wyniki, ale jedynie ostatnia, RS, posiada przydatność genetyczną. Problemy z rozróżnieniem między MDS a RS można rozwiązać przez fluorescencyjną mikroskopię próbek sierści.

Należy odnotować oczywiste rażące nieprawidłowości morfologiczne występujące u potomstwa.

2. DANE

Dane przedstawiane są jako ogólna liczba liczonego potomstwa oraz liczba osobników, u których zaobserwowano jedną lub więcej plamek mutacji somatycznej. Dane z grupy badanej oraz negatywnej są porównywane za pomocą odpowiednich metod. Dane przedstawiane są również na tle poszczególnych miotów.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— szczepy zastosowane w krzyżówkach,

— liczba ciężarnych samic w grupie badanej i grupach kontrolnych,

— średnia wielkość miotu w grupie badanej i grupach kontrolnych w chwili urodzenia oraz po zakończeniu ssania,

— wielkość dawki(dawek) testowej substancji chemicznej,

— zastosowany rozpuszczalnik,

— dzień ciąży, w którym podano substancję testową,

— droga podawania substancji testowej,

— ogólna liczba badanego potomstwa, oraz liczba potomstwa z WMVS, MDS i RS w grupie badanej i grupach kontrolnych,

— rażące nieprawidłowości morfologiczne,

— związek między poziomem dawki a reakcją osobników z RS, jeżeli to możliwe,

— analiza statystyczna,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. **Analiza i interpretacja**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. **ODNIESIENIA**

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

TRANSLOKACJA DZIEDZICZNOŚCI U MYSZY

1. METODA

1.1. Wstęp

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.2. Definicje

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

1.3. Substancje odniesienia

Brak.

1.4. Zasada metody badawczej

Badanie translokacji dziedziczności u myszy wykrywa strukturalne i ilościowe zmiany chromosomowe w komórkach zarodkowych ssaków zregenerowane w pierwszym pokoleniu potomstwa. Typy wykrytych zmian chromosomowych to obustronne translokacje oraz, jeżeli włącza się potomstwo płci żeńskiej, utrata chromosomu X. Nośniki translokacji i samice o genotypie XO wykazują zmniejszoną płodność, która jest używana do wyboru potomstwa F_1 do celów analizy cytogenetycznej. Całkowita bezpłodność jest spowodowana przez pewne typy translokacji (chromosom X-autosom i typu c-t). Translokacje są obserwowane w komórkach mejotycznych w diakinezie metafazy I u osobników męskich, również F_1, samców lub męskiego potomstwa samic F_1. Samice o genotypie XO są identyfikowane cytogenetycznie dzięki obecności tylko 39 chromosomów w komórkach szpiku kostnego przechodzących mitozę.

1.5. Kryteria jakościowe

Brak.

1.6. Opis metody badawczej

Przygotowania

Substancje testowe rozpuszczane są w izotonicznym roztworze soli. Substancje chemiczne nierozpuszczalne w wodzie są rozpuszczane lub zawieszane we właściwych nośnikach. Należy zastosować świeże roztwory testowego związku chemicznego. Zastosowany nośnik nie powinien kolidować z testową substancją chemiczną ani powodować jakichkolwiek objawów toksyczności.

Drogi podawania substancji

Zwyczajowe drogi podawania substancji to intubacja drogą pokarmową lub iniekcja dootrzewnowa. Inne drogi podawania substancji testowej mogą być również właściwe.

Zwierzęta badane

W celu ułatwienia hodowli i cytologicznej weryfikacji, niniejsze badania przeprowadzane są na myszach. Nie jest wymagany szczególny szczep myszy. Jednakże średni rozmiar miotu powinien być większy, niż osiem osobników i powinien być stosunkowo stały. Należy wykorzystać zdrowe, dojrzałe płciowo zwierzęta.

Liczba zwierząt

Wymagana liczba zwierząt zależy od częstotliwości samorzutnej translokacji oraz minimalnego stopnia wywoływania objawów, w celu uzyskania wyniku pozytywnego.

Badanie zazwyczaj przeprowadzane jest przez analizę potomstwa samców F_1. Należy poddać badaniu co najmniej 500 samców potomstwa F_1 w danej grupie dawkowania. W przypadku włączenia samic potomstwa F_1, wymagane jest 300 samców i 300 samic.

Użycie negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych

Powinny zostać udostępnione odpowiednie dane uzyskane z równoległych i bazowych grup kontrolnych. W przypadku dostępności wyników pozytywnej grupy kontrolnej uzyskanych w z badań ostatnio przeprowadzanych w tym samym laboratorium, wyniki te można zastosować zamiast równoległej pozytywnej grupy kontrolnej.

Poziomy dawek

Badany jest jeden poziom dawki, zazwyczaj najwyższy poziom dawki związany jest z produkcją minimalnych objawów toksyczności, ale nie ma wpływu na zachowania związane z rozrodczością lub przeżyciem osobników. W celu ustalenia zależności między poziomem dawki a reakcją wymagane jest zastosowanie dwóch dodatkowych poziomów dawek. W przypadku nietoksycznych substancji chemicznych, należy zastosować ekspozycję na najmniejszy stosowany poziom dawki.

Procedura

Poddanie działaniu substancji testowej oraz krycie

Wymagane są dwa harmonogramy podawania substancji. Najszerzej stosowane jest jednorazowe podanie substancji testowej. Stosować można również podawanie substancji testowej siedem dni w tygodniu przez okres 35 dni. Liczba kryć po zakończeniu podawania substancji regulowana jest harmonogramem badań w celu zapewnienia uzyskania próbek z wszystkich faz komórki zarodkowej. Po zakończeniu okresu krycia samice należy umieścić w pojedynczych klatkach. W przypadku porodu samic, należy odnotować datę, wielkość miotu oraz płeć potomstwa. Całe potomstwo zawierające osobniki samców jest odzwyczajane od ssania, a potomstwo zawierające samice jest odrzucane, chyba że jest włączone do badania.

Badanie translokacji heterozygotyczności

Stosowana jest jedna z dwóch możliwych metod:

— badanie płodności potomstwa F_1 i późniejsza weryfikacja ewentualnych nośników translokacji przez przeprowadzenie analiz cytogenicznych,

— analizy cytogenetyczne całego męskiego potomstwa F_1 bez wcześniejszej selekcji przez badanie płodności.

a) Badanie płodności

Zmniejszona płodność osobnika F_1 może być stwierdzona na podstawie obserwacji rozmiarów potomstwa i/lub analizy zawartości macic samic.

Należy określić kryteria dla ustalania normalnej i obniżonej płodności wykorzystanego szczepu myszy.

Obserwacje wielkości miotu: samce F_1 przeznaczone do badania umieszczane są w klatkach pojedynczo z samicami zarówno z tego samego badania jak i z koloni. Klatki kontroluje się codziennie, zaczynając od 18 dnia po kryciu. Wielkość miotu oraz płeć potomstwa F_2 odnotowane są po urodzeniu, a następnie mioty są odrzucane. W przypadku badania potomstwa żeńskiego F_1, potomstwo F_2 małych miotów jest zachowywane w celu przeprowadzenia dalszych badań. Żeńskie nośniki translokacji są weryfikowane za pomocą analiz translokacji u ich męskiego potomstwa. Samice XO są rozpoznawane przez zmianę wskaźnika płci u ich potomstwa wynoszącego od 1:1 do 1:2 osobników samczych do samic. W procedurze sekwencyjnej normalne zwierzęta F_1 są eliminowane z dalszych badań, jeżeli pierwszy miot F_2 osiągnął lub przekroczył wcześniej ustaloną wartość; w przeciwnym razie obserwacjom poddawany jest drugi lub trzeci miot F_2.

Zwierzęta F_1, których nie można zaklasyfikować jako normalne po zakończeniu obserwacji trzech miotów F_2, zostają poddane dalszemu badaniu przez analizę zawartości macicznych albo bezpośrednio poddawane analizom cytogenetycznym.

Analiza zawartości macicznej: Redukcja rozmiaru miotu z nośnikami translokacji spowodowana jest śmiercią zarodkową tak, że wysoka liczba martwych implantów jest przejawem obecności translokacji u badanych zwierząt. F, samce mające być poddane badaniu wykorzystywane są do krycia dwóch lub trzech samic każdy. Poczęcie ustalane jest przez codzienną poranną kontrolę czopu nasienia w pochwie. Samice uśmiercane są 14–16 dni później, a żywe lub martwe implanty w ich macicach są odnotowywane.

b) Analiza cytogeniczna

Preparaty z jąder przygotowywane są techniką suszenia powietrzem. Nośniki translokacji rozpoznawane są przez obecność wielowartościowych konfiguracji w diakinezie metafazy I w podstawowych spermatocytach. Obserwacja co najmniej dwóch komórek z wielowartościowymi związkami stanowi wymagane dowody na potwierdzenie faktu, iż zwierzę posiada nośnik translokacji.

Wszystkie samce F_1 należy zbadać cytogenetycznie, jeżeli nie została przeprowadzona żadna selekcja podczas rozmnażania. Należy mikroskopowo oznaczyć minimum 25 komórek diakinezy metafazy I danego samca. Analiza metafaz mitotycznych w spermatogoniach bądź szpiku kostnym jest wymagana u samców F_1 z małymi jądrami i defektem mejozy przed diakinezą lub z samic F_1 z podejrzeniem genotypu XO. Obecność niezwykle długiego i/lub krótkiego chromosomu w każdej z 10 komórek jest dowodem na szczególną męską translokację prowadzącą do niepłodności (typ c-t). Niektóre translokacje chromosom X-autosom, które powodują męską niepłodność mogą być zidentyfikowane tylko na podstawie analizy pasmowej chromosomów mitotycznych. Obecność 39 chromosomów we wszystkich 10 mitozach jest dowodem na istnienie XO u samicy.

2. DANE

Dane należy przedstawić w formie tabeli.

W każdym okresie krycia należy odnotować średni rozmiar miotu oraz stosunek płci w potomstwie pochodzącym z rodzicielskiej pary przy urodzeniu i w okresie odzwyczajania od ssania.

Dla oszacowania płodności zwierząt F_1 przedstawiane są średnie wielkości potomstwa pochodzącego z normalnego krycia oraz ilość żyjących i nieżywych implantów z każdego krycia osobników F_1, gdzie odnotowano występowanie nośników translokacji. W celu dokonania analizy zawartości macicznej, należy odnotować średnią liczbę żywych i martwych implantów potomstwa pochodzącego z normalnego krycia oraz poszczególne liczby żyjących i martwych implantów dla każdego potomstwa gdzie odnotowano występowanie nośników translokacji.

Aby dokonać analizy cytogenetycznej diakinezy metafazy I, ilość typów wielowartościowych konfiguracji oraz całkowita liczba parzeń i czasu trwania krycia są odnotowywane.

W odniesieniu do bezpłodnych osobników F_1, należy odnotować ogólną liczbę kryć oraz czas trwania okresu krycia. Należy podać wagę jąder oraz szczegóły wyników analizy cytogenetycznej.

W odniesieniu do samic XO, odnotowana jest średnia wielkość miotu, stosunek płci potomstwa F_2 oraz wyniki analizy cytogenetycznej.

Jeżeli możliwe, potomstwo F_1 z nośnikami translokacji poddawane jest wcześniejszej selekcji przez badania płodności, tabele muszą zawierać informację, ile z nich zostało potwierdzonych jako translokacje heterozygotyczne.

Należy odnotować dane z badań negatywnych i pozytywnych grup kontrolnych.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— szczep myszy, wiek zwierząt, waga badanych zwierząt,

— liczba rodzicielskich zwierząt każdej płci w grupie badanej i grupach kontrolnych,

— warunki badania, szczegółowy opis badania, wielkości dawkowania, rozpuszczalniki, harmonogram krycia,

— liczba i płeć potomstwa danej samicy, liczba i płeć potomstwa hodowanego do analizy translokacji,

— czas i kryteria analizy translokacyjnej,

— liczba oraz szczegółowy opis nośników translokacji, włączając dane dotyczące rozmnażania i dane dotyczące zawartości macicznej, w odpowiednich przypadkach,

— procedury cytogenetyczne i szczegóły analizy mikroskopowej, najlepiej wraz ze zdjęciami,

— statystyczna analiza,

— analiza wyników,

— interpretacja wyników.

3.2. Analiza i interpretacja

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

4. ODNIESIENIA

Patrz „Wprowadzenie ogólne" część B.

CZĘŚĆ C: METODY USTALANIA EKOTOKSYCZNOŚCI

WPROWADZENIE OGÓLNE: CZĘŚĆ C

Niżej opisane metody badawcze określają niektóre właściwości ekotoksyczne wymienione w załączniku VIII to dyrektywy 79/831/EWG. Dokonujący notyfikacji powinni mieć świadomość, że metody określające poniższe właściwości przewidziane w poziomie 1 załącznika VIII nie zostały zawarte w treści:

— długotrwałe badania toksyczności z *Daphnia magna,*

— test wykonywany na roślinach wyższych,

— długotrwałe badania toksyczności u ryb,

— test akumulacji gatunku.

W odpowiednich przypadkach, metody badawcze dla ustalania niniejszych właściwości są finalizowane i zostaną opublikowane w formie dalszej adaptacji do postępu technicznego. Tymczasem dokonujący notyfikacji powinni wykorzystywać odpowiednie, międzynarodowo uznane metody, które należy przedstawić właściwym organom.

BADANIE ZAHAMOWANIA WZROSTU ALG

1. METODA

1.1. Wstęp

Celem tego badania jest ustalenie skutków działania substancji na wzrost jednokomórkowego gatunku zielonych alg. Odpowiednio krótkie testy mogą ocenić skutki działania substancji w kilku pokoleniach. Metoda ta może być przystosowana do wykorzystania w odniesieniu do kilku jednokomórkowych gatunków alg, w przypadku których opis użytej metody musi być zawarty w sprawozdaniu z badań.

Metoda ta łatwo stosowana jest z substancjami rozpuszczalnymi w wodzie, zgodnie z warunkami badania, które mogą utrzymać się w środowisku wodnym.

W odniesieniu do substancji o ograniczonej rozpuszczalności w badanej pożywce, ilościowe ustalenie EC_{50} może okazać się niemożliwe (patrz definicje poniżej).

Metoda może być użyta w odniesieniu do substancji, które nie kolidują bezpośrednio z pomiarem wzrostu alg.

Poniższe informacje mogą być pomocne do przeprowadzenia testu:

— rozpuszczalność w wodzie,

— ciśnienie pary,

— wzór strukturalny,

— czystość substancji

— chemiczna stabilność w środowisku wodnym i w świetle,

— metody analizy ilościowej substancji testowej w wodzie,

— wartość pK_a,

— współczynnik podziału oktanol/woda,

— wyniki gotowych badań biodegradacji.

1.2. Definicje i jednostki

Skupienie komórek: liczba komórek na milimetr;

Wzrost: wzrost skupienia komórek w okres badania;

Wskaźnik wzrostu: wzrost skupienia komórek w danej jednostce czasowej;

EC_{50}: w niniejszej metodzie, takie stężenie substancji testowej, które powoduje 50 % redukcję wzrostu lub wskaźnika wzrostu w stosunku do grupy kontrolnej;

NOEC (brak zaobserwowanych skutków koncentracji): w niniejszej metodzie, najwyższe stężenie testowej substancji, przy którym mierzony parametr (parametry) wykazuje (wykazują) nieznaczne zahamowanie wzrostu w stosunku do wartości kontrolnych.

1.3. Substancje odniesienia

Substancja odniesienia może być badana jako środek wykrywający niezadowalające warunki badania, jeżeli substancja odniesienia jest użyta, wyniki należy podać w sprawozdaniu z badań. Jako substancję odniesienia można zastosować dwuchromian potasu.

1.4. Zasada metody badawczej

Gwałtownie rosnące kultury wybranych alg zielonych są poddawane ekspozycji na różne stężenia substancji testowej przez kilka pokoleń w określonych warunkach. Zahamowanie wzrostu w stosunku do kultury kontrolnej ustalane jest przez ustalony okres czasu.

1.5. **Kryteria jakościowe**

1.5.1. *Warunki wymagane dla ważności badania*

Skupienie komórek w hodowlach kontrolnych powinno wzrosnąć o czynnik w wysokości co najmniej 16 w ciągu trzech dni.

Zniknięcie substancji testowej z wody i przemiana w biomasę niekoniecznie unieważnia badanie.

1.6. **Opis procedury badawczej**

1.6.1. *Przygotowanie*

1.6.1.1. Sprzęt i materiały

— wykły sprzęt laboratoryjny,

— olby testowe o odpowiedniej pojemności (np. odpowiednie będą 250 ml kolby stożkowe w przypadku gdy objętość testowego roztworu wynosi 100 ml),

— aparatura do uprawy: kabina lub komora, w której można utrzymywać temperaturę 21–25 ± 2 °C, oraz stałe jednolite oświetlenie o zakresie widmowym 400–700 nm. (Zalecany jest strumień kwantowy w wysokości $0{,}72 \times 10^{20}$ fotonów/m^2s w ± 20 %. Ten strumień kwantowy równy jest 120 µE/m^2s i może być otrzymany z uniwersalnych białych lamp fluorescencyjnych (temperatura światła około 4 200 K) dając około 8 000 luksów mierzonych za pomocą sferycznego kolektora.)

— urządzenia do ustalania skupiska komórek, np. elektroniczny licznik cząsteczek, mikroskop z komorą do liczenia, fluorymetr, spektrofotometr, kolorymetr (*Uwaga:* w celu dostarczenia użytecznych pomiarów przy niskich skupiskach cząsteczek w przypadku korzystania ze spektrofotometra, koniecznym może okazać się wykorzystanie kuwet z co najmniej 4 cm ścieżką światła).

1.6.1.2. Pożywka alg

Zaleca się poniższe pożywki:

NH_4Cl:	15	mg/l
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l
KH_2PO_4:	1,6	mg/l
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l
H_3BO_3	0,185	mg/l
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2.6H_2O$:	$1{,}5 \times 10^{-3}$	mg/l
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l
$NaHCO_3$:	50	mg/l

Współczynnik pH tej pożywki po zrównoważeniu powietrzem wynosi w przybliżeniu 8.

Użycie innej pożywki nie jest wykluczone przez powyższe zalecenia, jednakże pod warunkiem że przestrzegane są poniższe limity niezbędnych składników:

P:	≤ 0,7 mg/l,
N	≤ 10 mg/l,
związki chelatowe:	≤ 10^{-3} mmol/l,
twardość (Ca + Mg):	≤ 0,6 mmol/l.

Zalecana pożywka i pożywka podana w odniesieniu (1) spełniają niniejszy wymóg.

1.6.1.3. Organizmy badane

Wybór gatunków

Proponowane jest wykorzystanie gatunków zielonych alg, które jako gatunki szybko rosnące, są wygodne w uprawie i badaniu. Poniższe gatunki uważa się za odpowiednie:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP211/11b.

W przypadku użycia innych gatunków należy odnotować rodzaj szczepu.

1.6.1.4. Projekt badania

Początkowe skupienie komórek

Zaleca się aby początkowe skupienie komórek w badanych kulturach wynosiło w przybliżeniu 10^4 komórek/ml dla *Selenastrum capricornutum* i *Scenedesmus subspicatus*. W przypadku użycia innych gatunków, biomasa powinna być porównywalna.

Stężenia substancji testowej

Wartość stężenia, przy którym prawdopodobne jest pojawienie się objawów, ustalana jest w oparciu o wyniki badań wartości stężeń. Do celów badania należy wybrać co najmniej pięć wartości stężeń uszeregowanych geometrycznie. Najniższe badane stężenie nie powinno wywoływać żadnych zauważalnych skutków w odniesieniu do wzrostu alg. Najwyższe badane stężenie powinno hamować wzrost o co najmniej 50 % w odniesieniu do grupy kontrolnej, a najbardziej pożądane jest zupełne zahamowanie wzrostu.

Replikacje i grupy kontrolne

Projekt badania powinien obejmować najlepiej trzy replikacje przy każdym testowym stężeniu oraz najlepiej podwójną liczbę grup kontrolnych. W uzasadnionych przypadkach, projekt badania może zostać zmieniony w celu zwiększenia liczby stężeń i obniżenia liczby replikacji przy danym stężeniu.

W przypadku użycia nośnika w celu rozpuszczenia substancji testowej, projektem należy objąć dodatkowe grupy kontrolne, dla których stosuje się nośnik z najwyższymi stężeniami używanymi w badanych kulturach.

1.6.2. *Przeprowadzenie badania*

Niniejsza sekcja zawiera wytyczne dla badania łatwo rozpuszczalnych i słabo rozpuszczalnych substancji oraz substancji lotnych.

1.6.2.1. Badanie substancji łatwo rozpuszczalnych w wodzie

Badane kultury zawierające pożądane stężenia substancji testowej oraz pożądaną ilość inokulum alg, przygotowywane są przez rozcieńczenie przefiltrowaną pożywką alg, podwielokrotność roztworów podstawowych substancji testowych i zawiesiną alg.

Należy wstrząsnąć kolbami hodowlanymi i umieścić je w aparaturze do uprawy. W czasie trwania badania, istotne jest utrzymywanie alg w zawieszeniu i ułatwienie przenoszenia CO_2. W tym celu można wykorzystać wstrząsanie, mieszanie lub napowietrzanie. Kultury należy utrzymywać w zakresie temperatur 21–25 °C, kontrolowanych przy ± 2 °C.

Skupienie komórek w każdej kolbie ustalane jest co najmniej 24, 48 i 72 godziny po rozpoczęciu badania. Przefiltrowana pożywka alg wykorzystywana jest w celu ustalenia tła w przypadku użycia liczników cząsteczek lub jako próbka ślepa w przypadku użycia spektrofotometrów.

Współczynnik pH mierzony jest na początku badania i po 72 godzinach.

Współczynnik pH roztworów nie powinien odstępować o więcej niż jedną jednostkę w czasie trwania badania.

1.6.2.2. Badanie substancji z ograniczoną rozpuszczalnością w wodzie

W przypadku gdy rozpuszczalność substancji jest rzędu najwyższej wielkości stężenia wykorzystywanego w badaniu, wymagane są jedynie niewielkie odchylenia od powyższej procedury w celu przygotowania badanych roztworów. Nasycony roztwór może służyć jako roztwory podstawowe substancji testowych. Innym sposobem może być rozcieńczenie substancji testowej przy pożądanym stężeniu w pożywce algowej, przed wprowadzeniem zawiesiny algowej.

Roztwory zapasowe substancji charakteryzujących się niską rozpuszczalnością w wodzie mogą być przygotowane przez mechaniczną dyspersję lub przez użycie nośników o niskiej toksyczności w stosunku do alg, takich jak rozpuszczalniki organiczne, emulgatory czy dyspersanty. W przypadku użycia nośnika stężenie nie powinno przekraczać 100 mg/litr i należy włączyć dodatkowe grupy kontrolne do projektu badania, w których zawarty jest nośnik o najwyższym stężeniu obecny w roztworach testowych.

1.6.2.3. Badanie substancji lotnych

Do chwili obecnej nie ustalono żadnej ogólnie przyjętej metody badania substancji lotnych. W przypadku gdy wiadome jest, że substancja posiada tendencje do parowania, wykorzystać można zamknięte kolby testowe o powiększonych otworach wylotowych. Zaproponowano pewne odmiany tej metody (patrz odnośnik (1)).

Należy podjąć próby ustalenia ilości substancji, która pozostaje w roztworze, przy zaleceniu wyjątkowej ostrożności przy interpretacji wyników badań lotnych substancji chemicznych z wykorzystaniem systemów zamkniętych.

2. **DANE I OCENA**

Dokonane pomiary skupisk komórek w badanych kulturach i grupach kontrolnych należy umieścić w jednej tabeli wraz ze stężeniami substancji badanej oraz czasem dokonywania pomiarów. Średnia wartość skupiska komórek dla każdej wielkości stężenia substancji testowej i dla grup kontrolnych nanoszona jest na wykres względem czasu, w celu uzyskania krzywej wzrostu.

W celu ustalenia korelacji między wielkością stężenia a wywołanymi skutkami, należy zastosować dwa poniższe podejścia:

2.1. **Porównanie obszarów poniżej krzywej wzrostu**

Obszar poniżej krzywych wzrostu można obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

A = obszar,

N_0 = liczba nominalna komórek/ml w danym czasie t_0,

n_1 = zmierzona liczba komórek/ml przy t_1,

N_n = zmierzona liczba komórek/ml w danym czasie t_n,

t_1 = czas dokonania pierwszego pomiaru po rozpoczęciu badania,

t_n = czas n^{th} pomiaru po rozpoczęciu badania

Wartość procentowa zahamowania wzrostu komórki przy każdej wielkości stężenia substancji testowej (I_A) jest obliczana jako różnica między obszarem między krzywą wzrostu grupy kontrolnej (A_c) a obszarem pod krzywą wzrostu przy każdej wielkości stężenia substancji testowej (A_t) jako:

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

Wartości I_A nanoszone są na papier logarytmiczny lub półlogarytmiczny względem odpowiadających stężeń. W przypadku nanoszenia na papier półlogarytmiczny, punkty dopasowywane są za pomocą linii prostej na oko, lub, w przypadku możliwości przyjęcia normalnej dystrybucji logarytmicznej, można wykreślić wyliczoną linię regresji.

Wartość EC_{50} wynika z punktu przecięcia linii (regresji) z prostą równoległą wykreśloną na odciętej I_A = 50 %. W celu jednoznacznego oznaczenia niniejszej wartości w związku z niniejszą metodą obliczeniową, proponuje się wykorzystanie symbolu E_bC_{50}. W związku z niniejszą metodą, która określa pomiary po 24, 48 i 72 godzinach, symbol zmienia się na E_bC5_0 (0–72 h).

Inne wartości WE, takie jak E_bC_{10}, również będzie można uzyskać z wykresu I_A względem koncentracji logarytmicznej.

2.2. **Porównanie wskaźników wzrostu**

Średni szczególny wskaźnik wzrostu (μ) dla gwałtownie rosnących kultur można obliczyć jako:

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

Ewentualnie średni szczególny wskaźnik wzrostu można uzyskać z nachylenia linii regresji wykresu ln N względem czasu.

Procentowe obniżenie średniego szczególnego wskaźnika wzrostu dla każdego stężenia substancji testowej w porównaniu z wartością z grupy kontrolnej jest nanoszone na logarytm stężenia. Ich EC_{50} można odczytać z uzyskanego wykresu. W celu jednoznacznego oznaczenia EC_{50} uzyskanego niniejszą metodą, proponuje się wykorzystanie symbolu E_rC_{50}. Należy wskazać czasy dokonywania pomiaru, np. jeżeli wartość odnosi się do czasów obserwacji 24 i 48 godzin, obowiązuje symbol E_rC_{50} (24–48 h).

Uwaga: szczególny wskaźnik wzrostu jest terminem logarytmicznym, a małe zmiany we wskaźniku wzrostu mogą doprowadzić do dużych zmian w biomasie. Dlatego też wartości E_bC i E_rC nie są numerycznie porównywalne.

3. **SPRAWOZDANIE**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— substancja testowa: dane identyfikacji substancji chemicznej,

— badane organizmy: pochodzenie, uprawa laboratoryjna, liczba szczepów, metody uprawy,

— warunki badania:

  — data rozpoczęcia oraz zakończenia badania i czas jego trwania,

  — temperatura,

  — skład pożywki,

— urządzenia do uprawy,
— pH roztworów przy rozpoczęciu oraz po zakończeniu badania (należy zamieścić dodatkowe wyjaśnienia w przypadku pochodnych pH lub obserwacji więcej niż jednej jednostki),
— używany nośnik lub metoda w celu rozpuszczenia substancji testowej i stężenia nośnika w roztworach testowych,
— intensywność i jakość światła,
— badane stężenia (pomiarowe lub nominalne),

— wyniki:
— skupisko komórek w każdej kolbie w każdym punkcie pomiaru i metoda pomiaru skupienia komórek,
— średnie wartości skupienia komórek,
— krzywe wzrostu,
— graficzne przedstawienie związku między stężeniem a jego skutkiem,
— wartości i metody obliczania WE,
— NOEC,
— inne obserwowane skutki.

4. **ODNIESIENIA**

1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania* 201, decyzja Rady C(81) 30 ostateczna.
2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*", in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

Dodatek

PRZYKŁADOWA PROCEDURA UPRAWY ALG

Uwagi ogólne

Celem uprawy w oparciu o poniższą procedurę jest uzyskanie kultur alg dla badań nad toksycznością.

Należy użyć odpowiednie metody w celu zapewnienia, iż kultury alg nie są zainfekowane bakterią (ISO 4833). Wskazane jest użycie kultur jałowych, ale niezbędne są kultury jednogatunkowe.

Wszystkie czynności mogą zostać przeprowadzone w sterylnych warunkach w celu uniknięcia skażenia bakterią lub innymi algami.

Sprzęt i materiały

Patrz ppkt 1.6.1: Przygotowania i organizmy badane.

Procedury uzyskiwania kultur alg

Przygotowanie składników roztworów (pożywka)

Wszystkie składniki soli danej pożywki przygotowywane są jako stężone roztwory podstawowe i magazynowane bez dostępu światła i w niskiej temperaturze. Niniejsze roztwory sterylizowane są przez filtrację lub przez autoklawowanie.

Pożywka przygotowywana jest przez dodanie odpowiedniej ilości roztworów podstawowych do sterylnej wody destylowanej, dbając o to aby pożywka nie została zainfekowana. Do pożywki stałej dodaje się 0,8 % agaru.

Kultura macierzysta

Kultury macierzyste stanowią małe kultury alg, które regularnie przenoszone są na świeże pożywki w celu wykorzystania jako początkowy materiał badania. W przypadku gdy kultury nie są regularnie wykorzystywane, pokrywane są smugami na nachylonych probówkach agarowych. Niniejsze kultury przenoszone są na świeżą pożywkę co najmniej raz na dwa miesiące.

Kultury macierzyste hodowane są w stożkowatych kolbach zawierających właściwą pożywkę (objętość około 100 ml). W przypadku gdy inkubacja alg następuje w temperaturze 20 °C przy stałym oświetleniu, kulturę należy przenosić raz w tygodniu.

W trakcie przenoszenia na świeżą pożywkę całość „starej" kultury przenoszona jest za pomocą sterylnych pipet do kolby zawierającej świeżą pożywkę, tak aby w przypadku szybko rosnących gatunków, początkowe skupienie było około 100 razy mniejsze niż skupienie „starej" kultury.

Wskaźnik wzrostu gatunku można ustalić na podstawie krzywej wzrostu. Jeżeli niniejsze dane są dostępne, możliwe jest prognozowanie gęstości w jakiej należy przenosić kulturę na nową pożywkę. Należy tego dokonać zanim kultura osiągnie fazę śmierci.

Uprawa wstępna

Uprawa wstępna przeprowadzana jest w celu uzyskania alg w ilości odpowiedniej dla zaszczepienia kultur badanych. Uprawa wstępna inkubowana jest zgodnie z warunkami badania i wykorzystywana w przypadku jej dalszego gwałtownego wzrostu, zazwyczaj po okresie inkubacji przez około trzy dni. W przypadku gdy kultury alg zawierają zdeformowane lub anormalne komórki, muszą zostać zniszczone.

TOKSYCZNOŚĆ DŻDŻOWNIC

BADANIE SZTUCZNEJ GLEBY

1. METODA

1.1. Wstęp

W tym badaniu laboratoryjnym substancja testowa dodawana jest do sztucznej gleby, w której umieszcza się dżdżownice na okres 14 dni. Po zakończeniu tego okresu (i opcjonalnie po siedmiu dniach) badane są skutki śmiertelności dżdżownic wywołane przez substancję testową. Badanie dostarcza metody na względnie krótkoterminowe badanie skutków substancji chemicznej na dżdżownice pobieranej przez skórę i układ pokarmowy.

1.2. Definicja i jednostka

LC_{50}: Stężenie substancji testowej ocenione jako powodujące śmierć u 50 % badanych zwierząt w okresie przeprowadzania badania.

1.3. Substancje odniesienia

Substancja odniesienia używana jest okresowo jako środek pozwalający określić, iż czułość systemu badawczego nie uległa znacznej zmianie.

Analityczny stopień chloroacetamidu zalecany jest jako substancja odniesienia.

1.4. Zasada badania

Ziemia stanowi zmienną pożywkę, dlatego też do tego badania wykorzystywana jest starannie określona sztuczna gleba. Dorosłe dżdżownice z gatunku *Eisenia foetida* (patrz uwaga w Dodatku) utrzymywane są w ściśle określonej sztucznej glebie poddawanej działaniu różnych stężeń substancji testowej. Zawartość zbiorników rozłożona jest na tacach przez okres 14 dni (i opcjonalnie przez siedmiu dniach) po rozpoczęciu badania, oraz zliczane są osobniki pozostałe przy życiu po ekspozycji na działanie każdej wielkości stężenia substancji testowej.

1.5. Kryteria jakościowe

Badanie zaprojektowano w taki sposób, aby było jak najbardziej odtwarzalne w odniesieniu do badanego substratu i organizmu. Śmiertelność w grupach kontrolnych nie może przekraczać 10 % po zakończeniu badania, w przeciwnym razie badanie uważa się za nieważne.

1.6. Opis metody badawczej

1.6.1. *Materiały*

1.6.1.1. Substrat testowy

Zdefiniowana sztuczna gleba używana jest jako podstawowy substrat testowy.

a) Podstawowy substrat (procenty w przeliczeniu na suchą masę)

— 10 % torf sfagnowy (o możliwie jak najbardziej zbliżonym pH 5,5–6,0 bez widocznych pozostałości roślinnych i drobnomielony),

— 20 % gliny laolinitowej najlepiej z ponad 50 % zawartością kaolinitu,

— około 69 % przemysłowego piasku kwarcowego (przewaga piasku drobnoziarnistego z ponad 50 % zawartością cząsteczek o wielkości 0,05–0,2 mm). W przypadku gdy substancja nie rozrzedza się w wodzie w sposób wystarczający, 10 g badanego substratu należy zachować z danego zbiornika w celu późniejszego zmieszania z substancja testową,

— dodaje się około 1 % węglanu wapnia ($CaCO_3$), sproszkowanego, chemicznie czystego w celu uzyskania pH do 6,0 ± 0,5.

b) Substrat testowy

Substrat testowy zawiera substrat podstawowy, substancję testową i dejonizowaną wodę.

Zawartość wody wynosi około 25–42 % suchej masy substratu podstawowego. Zawartość wody w substracie, ustalana jest przez osuszanie próbki do stałej masy przy 105 °C. Kluczowym kryterium jest nawilżanie sztucznej gleby do takiego momentu, aby nie powstały wody stojące. Należy zachować ostrożność podczas mieszania w celu równomiernego rozłożenia substancji testowej i substratu. Sposób wprowadzenia substancji testowej do substratu należy opisać.

c) Substrat kontrolny

Substrat kontrolny zawiera substrat podstawowy i wodę. W przypadku wprowadzenia dodatkowego czynnika, dodatkowy substrat kontrolny powinien zawierać tę samą ilość dodatkowego czynnika.

1.6.1.2. Zbiorniki testowe

Szklane zbiorniki o pojemności około jednego litra (odpowiednio przykryte plastikowymi pokrywkami, naczynia lub folie z tworzywa sztucznego z otworami wentylacyjnymi) wypełnione pewną ilością nawilżonego lub kontrolnego substratu, równowartość 500 g suchej masy substratu.

1.6.2. *Warunki badania*

Zbiorniki należy przechowywać w klimatyzowanych komorach w temperaturze 20 ± 2 °C w stałym oświetleniu. Natężenie oświetlenia powinno wynosić 400–800 luksów.

Okres badania wynosi 14 dni, ale śmiertelność można fakultatywnie ocenić na siedem dni po rozpoczęciu badania.

1.6.3. *Procedura badania*

Stężenia substancji testowej

Stężenia substancji testowej wyrażone są jako waga substancji na suchą masę substratu podstawowego (mg/kg).

Test ustalania zakresu stężeń

Wielkość stężeń powodująca śmiertelność 0–100 % można ustalić przez test ustalania zakresu stężeń w celu przekazania informacji o zakresie stężeń wykorzystywanym w ostatecznym badaniu.

Substancję należy zbadać przy następujących wielkościach stężeń: 1000; 100; 10; 1; 0,1 mg substancji/kilogram badanego substratu (sucha masa).

W przypadku przeprowadzenia w pełni badania ostatecznego, jedna grupa badana na daną wielkość stężenia i jedna grupa kontrolna niepoddana działaniu substancji, każda zawierająca 10 dżdżownic, powinna być wystarczająca w celu wykonania testu ustalania zakresu stężeń.

Badanie ostateczne

Wyniki testu ustalania zakresu stężeń wykorzystywane są w celu wybrania co najmniej pięciu wielkości stężeń uszeregowanych geometrycznie, obejmujących zakres 0–100 % śmiertelności i różniących się stałym czynnikiem nieprzekraczającym 1,8.

Badania wykorzystujące te serie stężeń powinny umożliwić ustalenie wartości LC_{50} oraz jej granic pewności najdokładniej jak to możliwe.

W badaniu ostatecznym należy użyć co najmniej cztery grupy badane przy danej wielkości stężenia i cztery grupy kontrolne niepoddane działaniu substancji, każda zawierająca 10 dżdżownic. Wyniki takich replikujących grup podawane są jako średnia i odchylenie standardowe.

W przypadku gdy dwa równoległe stężenia o wielkości 1,8, powodują 0 % i 100 % śmiertelności, takie dwie wartości są wystarczające do oznaczenia zakresu, w którym obniża się LC_{50}.

Mieszanina podstawowego substratu testowego i substancji testowej.

Badany substrat, jeżeli możliwe, nie powinien zawierać dodatkowych czynników innych niż woda. Bezpośrednio przed rozpoczęciem badania, zawiesina substancji testowej lub substancja testowa rozrzedzona w dejonizowanej wodzie lub innym rozpuszczalniku jest mieszana z podstawowym substratem testowym, lub równomiernie nad nim rozpylana za pomocą drobnego spryskiwacza chromatograficznego lub podobnego.

Jeżeli substancja testowa nie jest rozpuszczalna w wodzie, może być rozpuszczona w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, w możliwie jak najmniejszej ilości (np. heksan, aceton lub chloroform).

Jedynie czynniki łatwo ulatniające się mogą być użyte w celu rozpuszczenia, rozrzedzenia lub zemulgowania substancji testowej. Badany substrat należy wietrzyć przed użyciem. Należy uzupełniać ilość wyparowanej wody. Grupa kontrolna powinna zawierać tę samą ilość każdego dodawanego czynnika.

Jeżeli substancja testowa jest nierozpuszczalna, nierozrzedzalna lub nie emulguje w rozpuszczalnikach organicznych, należy zmieszać 10 g drobnoziarnistego piasku kwarcowego oraz taką ilość substancji testowej, jaka wymagana jest przy 500 g suchej masy sztucznej gleby z 490 g suchej masy badanego substratu.

W odniesieniu do każdej badanej grupy, należy umieścić ilość nawilżonego badanego substratu równą 500 g suchej masy w każdym szklanym zbiorniku wraz z 10 dżdżownicami, które przebywały przez okres 24 godzin w podobnych warunkach tj. w warunkach nawilżonego substratu podstawowego, a następnie zostały szybko umyte, a nadwyżka wody została wchłonięta w bibułę filtracyjną przed użyciem.

Zbiorniki przykrywa się perforowanymi plastikowymi pokrywkami, naczyniami lub folią w celu zapobieżenia wysychaniu substratu i utrzymuje się je w warunkach badania przez okres14 dni.

Oszacowania należy dokonać 14 dni (opcjonalnie po siedmiu dniach) po rozpoczęciu badania. Substrat rozkładany jest na szklanej płytce lub płytce wykonanej ze stali nierdzewnej. Należy przeprowadzić badanie dżdżownic oraz ustalić liczbę osobników pozostałych przy życiu. Dżdżownice uważa się za martwe, jeżeli nie reagują na delikatne bodźce mechaniczne oddziałujące z przodu organizmu osobnika.

W przypadku gdy badanie przeprowadzane jest po siedmiu dniach, zbiornik ponownie napełniany jest substratem testowym, a osobniki pozostałe przy życiu są przenoszone na powierzchnię z tym samym substratem testowym.

1.6.4. *Badane organizmy*

Organizmy poddane badaniu powinny być osobnikami dorosłymi *Eisenia foetida* (patrz uwagi w Dodatku) (w wieku dwóch miesięcy życia z ukształtowanym siodełkiem) o wadze nawilżonego ciała 300–600 mg. (Metody uprawy patrz Dodatek).

2. DANE

2.1. Obróbka i analiza wyników

Stężenia testowej substancji odnotowywane są w odniesieniu do procentowej ilości martwych dżdżownic.

Jeżeli dane są zadowalające, należy ustalić wartość LC_{50} oraz limity pewności (p = 0,05), wykorzystując standardowe metody (Litchfield i Wilcoxon, 1949, metoda równoważna). LC_{50} należy podać jako miligram substancji testowej na kilogram badanego substratu (sucha masa).

W przypadkach gdy nachylenie krzywej stężenia jest zbyt strome, aby umożliwić obliczenie LC_{50}, wystarczające jest graficzne oszacowanie tej wartości.

W przypadku gdy dwie kolejne wielkości stężenia o wskaźniku w wysokości 1,8 powodują jedynie śmiertelność 0 % i 100 %, te dwie wartości są wystarczające do oznaczenia granicy, przy której obniża się LC_{50}.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— stwierdzenie, że badanie zostało przeprowadzone zgodnie z wyżej wymienionymi kryteriami jakości,

— przeprowadzone badanie (badanie zakresu wielkości stężeń i/lub badanie ostateczne),

— dokładny opis warunków badania lub stwierdzenie, że badanie zostało przeprowadzone zgodnie z metodą; wszelkie odstępstwa od procedury metody należy odnotować,

— dokładny opis procedury mieszania substancji testowej z podstawowym substratem testowym,

— informacja o badanych organizmach (gatunki, wiek, średnia oraz rozpiętość wagi, warunki hodowli i utrzymywania, dostawca),

— metoda używana w celu ustalenia LC_{50},

— wyniki badania łącznie ze wszelkimi wykorzystanymi danymi,

— opis obserwowanych objawów i zmian w zachowaniu badanych organizmów,

— śmiertelność w grupach kontrolnych,

— LC_{50} lub najwyższa wielkość stężenia testowego niepowodująca śmiertelności oraz najniższa wielkość stężenia powodująca 100 %, śmiertelności na 14 dni (oraz fakultatywnie siedem dni) po rozpoczęciu badania,

— wykreślanie krzywej/stężenia w odniesieniu do powodowanej reakcji,

— wyniki otrzymane po zastosowaniu substancji odniesienia, oraz czy zostały połączone z obecnym badaniem, czy na podstawie wcześniejszej kontroli jakości.

4. ODNIESIENIA

1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania* 201, ostateczna decyzja Rady C(81) 30.

2) Edwards, C.A. i Lofty, J.R., 1977, *Biologia Dżdżownic,* Chapman i Hall, Londyn, str. 331.

3) Bouche, M.B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systétmatique,* Institut National de la Recherche Agronomique, str. 671.

4) Litchfield, J.T. i Wilcoxon, F., Uproszczona metoda oceny badań skutków dawkowania. *J. Pharm. Exp. Therap.,* tom 96, 1949, str. 99.

5) Komisja Wspólnot Europejskich, Rozwój standardowej metody laboratoryjnej odnośnie do oceny wpływu toksyczności substancji chemicznych na dżdżownice, Sprawozdanie 8714 EUR EN, 1983.

6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

Dodatek

Hodowla i utrzymywanie dżdżownic przed rozpoczęciem badania

W celu założenia hodowli zwierząt należy umieścić 30–50 dorosłych dżdżownic w zbiorniku hodowlanym zawierającym świeży substrat i usunąć po okresie 14 dni. Zwierzęta te można wykorzystać do hodowli kolejnych grup. Dżdżownice wylężone z kokonów wykorzystuje się do badania po osiągnięciu dojrzałości (zgodnie z zalecanymi warunkami po okresie dwóch do trzech miesięcy).

Warunki utrzymywania i hodowli

Komora klimatyczna:	temperatura 20 ± 2 °C najlepiej ze stałym oświetleniem (natężenie 400–800 luksów).
Zbiorniki hodowlane:	odpowiednio płytkie zbiorniki o pojemności 10–20 l.
Substrat:	*Eisenia foetida* może być hodowana w różnych ekskrementach zwierzęcych. Zaleca się użycie mieszaniny o składzie 50 % torfu i 50 % krowiego lub końskiego obornika jako pożywki hodowlanej. Pożywka powinna zawierać wartość pH w wysokości około 6–7 (regulowanej węglanem wapnia) oraz niską przewodność elektryczną (mniej niż 6 mmhos lub 0,5 % stężenia soli). Substrat należy odpowiednio nawilżać, ale niezbyt obficie. Oprócz wyżej wspomnianej metody, można zastosować inne odpowiednie procedury.

Uwaga: *Eisenia foetida* występuje w dwóch rasach, które niektórzy systematycy podzielili na dwa gatunki (Bouche, 1972). Gatunki te są podobne pod względem morfologicznym, ale jeden, *Eisenia foetida foetida,* posiada typowo poprzeczne paskowanie lub przedziały na segmentach, a drugi, *Eisenia foetida andrei,* takiego paskowania nie posiada, będąc jednocześnie różnobarwnego czerwonawego koloru. Jeżeli jest to możliwe, należy użyć *Eisenia foetida andrei*. Można użyć inne gatunki, jeżeli dostępna jest metodologia.

BIODEGRADACJA

BADANIE ZAHN – WELLENS

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Celem metody jest ocena wpływu całkowitej biodegradacji rozpuszczalnych w wodzie, nielotnych substancji organicznych w przypadku ich ekspozycji na stosunkowo wysokie stężenia drobnoustrojów w badaniu statycznym.

Może mieć miejsce fizyczna i chemiczna adsorpcja zawieszonych substancji stałych, co należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników (patrz 3.2).

Substancje przeznaczone do badania wykorzystuje się w stężeniach odpowiadających wartościom DOC w przedziale 50–400 mg/litr lub wartościom COD w przedziale 100–1000 mg/litr (DOC = rozwiązany węgiel organiczny; COD = chemiczne zapotrzebowanie tlenu). Te względnie wysokie stężenia posiadają zaletę wiarygodności analitycznej. Związki o właściwościach toksycznych mogą opóźnić lub zahamować proces degradacji.

W niniejszej metodzie pomiar stężenia rozwiązanego węgla organicznego lub chemicznego zapotrzebowania tlenu wykorzystywany jest w celu określenia całkowitej biodegradacji substancji testowej.

Równoczesne użycie szczególnej metody analitycznej może umożliwić ocenę podstawowej biodegradacji substancji (zanik pierwotnej budowy chemicznej).

Metodę stosuje się jedynie w odniesieniu do tych organicznych substancji testowych, które przy wielkości stężenia używanego w badaniu:

— są rozpuszczalne w wodzie w warunkach badania,

— posiadają nieznaczne ciśnienie pary w warunkach badania,

— nie hamują bakterii,

— są absorbowane w badanym systemie jedynie do pewnego stopnia,

— nie są tracone w wyniku wytwarzania piany z roztworu testowego,

Informacje dotyczące względnych części składowych materiału testowego będą użyteczne przy interpretacji otrzymanych wyników, w szczególności w tych przypadkach, gdzie wyniki są słabe lub marginalne.

Pożądane są informacje dotyczące wpływu toksyczności substancji na drobnoustroje w celu dokonania interpretacji słabych wyników oraz wyboru właściwych wielkości stężeń.

1.2. **Definicje i jednostki**

Wielkość degradacji osiągniętej na końcu badania odnotowywana jest jako „Biodegradacja w badaniu Zahn – Wellens":

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

gdzie:

D_T = (%) biodegradacji w czasie T,

C_A = wartości DOC (lub COD) w mieszaninie testowej zmierzone trzy godziny po rozpoczęciu badania (mg/l) (DOC = rozwiązany węgiel organiczny, COD = chemiczne zapotrzebowanie tlenu),

C_T = wartości DOC lub COD w mieszaninie testowej w chwili pobierania próbek (mg/l),

C_B = wartość DOC lub COD próbki ślepej w chwili pobierania próbek (mg/l),

C_{BA} = wartość DOC lub COD próbki ślepej, mierzona trzy godziny po rozpoczęciu testu (mg/l).

Stopień degradacji jest zaokrąglany do najbliższej pełnej wartości procentowej.

Procentową degradację stwierdza się jako procent ubytku DOC (lub COD) z substancji testowej.

Różnica między mierzoną wartością po trzech godzinach i obliczoną, lub najlepiej zmierzoną wartością początkową, może dostarczyć użytecznych informacji dotyczących wydzielania substancji (patrz 3.2, Interpretacja wyników).

1.3. **Substancje odniesienia**

W niektórych przypadkach, w przypadku badania nowych substancji, użyteczne mogą okazać się substancje odniesienia; jednakże nie można jeszcze zalecić szczególnych substancji odniesienia.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Aktywny szlam, pożywki mineralne i materiał testowy jako jedyne źródło węgla w roztworach wodnych umieszczane są razem w jednym z czterolitrowych szklanych zbiorników wyposażonych w mieszadło i napowietrzacz. Mieszanina jest mieszana i napowietrzana przy temperaturze 20–25 °C przy rozproszonym oświetleniu lub w ciemnym pomieszczeniu przez okres 28 dni. Proces degradacji jest kontrolowany przez oznaczanie wartości DOC (lub COD) w filtrowanym roztworze codziennie lub w innych właściwych, regularnych odstępach czasu. Stosunek wydzielonego DOC (lub COD) po każdym przedziale czasu do wartości, trzy godziny po rozpoczęciu, wyrażany jest jako procent biodegradacji i służy jako pomiar stopnia degradacji w danym czasie. Wynik nanoszony jest na wykres względem czasu, w celu uzyskania krzywej biodegradacji.

W przypadku użycia szczególnej metody analitycznej, można dokonać pomiaru zmian w stężeniu pierwotnej molekuły w wyniku biodegradacji (podstawowa biodegradacja).

1.5. **Kryteria jakościowe**

Odtwarzalność niniejszego badania została pozytywnie potwierdzona w próbie pierścieniowej.

Czułość metody jest przeważnie ustalana przez zmienność próbki ślepej i, w mniejszym stopniu, przez precyzyjne oznaczenie rozwiązanego węgla organicznego i poziomu badanego związku w roztworze.

1.6. **Opis procedury badawczej**

1.6.1. *Przygotowania*

1.6.1.1. Odczynniki

Woda testowa: woda pitna o zawartości węgla organicznego < 5 mg/litr. Łączne stężenie jonów wapnia i magnezu nie może przekraczać 2,7 mola/litr; w przeciwnym razie wymagane jest odpowiednie rozcieńczenie wodą dejonizowaną lub destylowaną.

Kwas siarkowy, analityczny odczynnik (A.R.):	50 g/l.
Roztwór wodorotlenku sodu:	40 g/1.
Mineralna pożywka: rozpuszczona w jednym litrze dejonizowanej wody:	
chlorek amonowy, NH_4Cl, czysty analitycznie:	38,5 g,
fosforan monosodowy diwodny, $NaH_2PO_4.2H_2O$, czysty analitycznie:	33,4 g,
fosforan monopotasowy, KH_2PO_4, czysty analitycznie:	8,5 g,
fosforan dipotasowy, K_2HPO_4, czysty analitycznie:	21,75 g.

Mieszanina służy zarówno jako pożywka, a także jako system buforowy.

1.6.1.2. Urządzenia

Szklane zbiorniki o pojemności czterech litrów (np. zbiorniki cylindryczne).

Mieszadło ze szklanym lub metalowym mieszakiem na odpowiednim trzonku (mieszak powinien obracać się około 5–10 cm ponad dnem zbiornika). W zamian można użyć magnetycznego mieszaka o długości trzonka 7–10 cm.

Szklana probówka o średnicy wewnętrznej 2–4 mm w celu doprowadzenia powietrza. Otwór probówki powinien być umieszczony około1 cm ponad dnem zbiornika.

Wirówka (około 3550 g).

Miernik pH.

Miernik rozpuszczonego tlenu.

Papierowe filtry.

Urządzenie do filtracji membrany.

Filtry membranowe, wielkość poru 0,45 µm. Filtry membranowe są odpowiednie w przypadku gdy potwierdzone jest, że nie przepuszczają węgla ani nie wchłaniają substancji w fazie filtracji.

Sprzęt analityczny do określania składu węgla organicznego i chemicznego zapotrzebowania tlenu.

1.6.1.3. Przygotowanie inokulum bakteryjnego

Aktywny szlam pochodzący z biologicznej oczyszczalni ścieków jest oczyszczany przez (wielokrotnie) odwirowywanie lub klarowanie wodą testową (powyżej).

Aktywny szlam musi być we właściwym stanie. Taki szlam uzyskać można z właściwie pracującej oczyszczalni ścieków. W celu uzyskania różnorodnych gatunków lub szczepów bakterii, można zmieszać inokulat pochodzący z różnych źródeł (np. różnych oczyszczalni ścieków, ekstraktów gleby, wód rzecznych itd.). Mieszaninę należy oczyszczać w sposób opisany powyżej.

W celu dokonania kontroli aktywnych szlamów, patrz „Kontrola funkcjonalna, poniżej".

1.6.1.4. Przygotowanie roztworów testowych

Do zbiornika używanego w badaniu należy dodać 500 ml wody testowej, 2,5 ml/litr mineralnej pożywki i aktywny szlam w ilości odpowiadającej 0,2–1,0 g/litr suchej masy w ostatecznej mieszaninie. Dodać wystarczającą ilość roztworu podstawowego substancji przeznaczonej do badania tak, aby stężenie DOC w wysokości 50–400 mg/litr dało mieszaninę końcową. Odpowiednie wartości COD wynoszą 100–1000 mg/litr. Przygotować wodę testową o ogólnej objętości jednego do czterech litrów. Wybór całkowitej ilości wody zależy od liczby próbek, mających być pobrane do określenia DOC lub COD oraz ilości koniecznej do przeprowadzenia procedury analitycznej.

Zazwyczaj ilość dwóch litrów uważana jest za wystarczającą. Zakłada się co najmniej jeden kontrolny zbiornik próbki ślepej w celu przeprowadzania badania równoległego z każdą serią; taki zbiornik zawiera jedynie aktywowany szlam i mineralną pożywkę składającą się z wody testowej o takiej samej ilości całkowitej, jak w zbiornikach używanych do badania.

1.6.2. *Przeprowadzenie badania*

Naczynia testowe są wytrząsane przy użyciu mieszadeł magnetycznych lub tradycyjnych (śmigłowych) w warunkach rozproszonego oświetlenia bądź w ciemności, w temperaturze 20–25 °C. Napowietrzanie jest dokonywane powietrzem pod ciśnieniem, czyszczonym za pomocą bawełnianego filtra oraz tryskawki, jeżeli konieczne. Nie należy dopuścić do osiadania szlamu a stężenie tlenu nie może obniżyć się poniżej 2 mg/litr.

Wartość pH należy kontrolować w regularnych odstępach czasu (np. codziennie) i dostosować do poziomu pH 7–8 w razie konieczności.

Straty spowodowane parowaniem są uzupełniane tuż przed każdorazowym pobieraniem próbek wodą dejonizowaną lub destylowaną, w wymaganej ilości. Należy zaznaczyć poziom płynu na zbiorniku przed rozpoczęciem badania. Nowe znaki nanosi się po każdorazowym pobieraniu próbek (bez napowietrzania i mieszania). Pierwsze próbki zawsze pobierane są na trzy godziny po rozpoczęciu badania w celu wykrycia absorpcji materiału testowego przez aktywny szlam.

Eliminacja materiału testowego następuje po określeniu DOC lub COD dokonywanym raz dziennie lub w innych regularnych odstępach czasu. Próbki ze zbiornika testowego oraz z próbką ślepą filtrowane są przez dokładnie oczyszczony filtr papierowy. Pierwsze 5 ml przefiltrowanej substancji testowej jest odrzucane. Szlamy trudne do przefiltrowania mogą być wcześniej usunięte przez 10-minutowe odwirowywanie. Oznaczenia DOC i COD dokonuje się co najmniej dwukrotnie. Badanie przeprowadza się przez okres 28 dni.

Uwaga: Mętne próbki filtrowane są przez filtry membranowe. Filtry membranowe nie mogą uwalniać ani wchłaniać żadnego materiału organicznego.

Funkcjonalna kontrola aktywnego szlamu

Zbiornik zawierający znaną substancję należy prowadzić równolegle z każdą badaną serią w celu kontroli funkcjonalnej wydajności aktywnego szlamu. W tym celu przydatny jest dietylenoglikol.

Przystosowanie

Jeżeli analizy przeprowadzane są w stosunkowo krótkich odstępach czasu (np. raz dziennie), przystosowanie można łatwo rozpoznać po krzywej degradacji (patrz wykres 2). Dlatego też niniejszego badania nie należy rozpoczynać bezpośrednio przed weekendem.

W przypadku gdy dostosowanie wystąpi na końcu okresu badania, badanie możne zostać przedłużone do chwili zakończenia degradacji. Z tego powodu badania nie należy rozpoczynać bezpośrednio przed końcem tygodnia.

Uwaga: Jeżeli konieczna jest szersza wiedza w zakresie zachowania dostosowanego szlamu, ten sam aktywny szlam należy poddać działaniu tego samego materiału testowego zgodnie z następującą procedurą:

Należy wyłączyć mieszadło oraz napowietrzacz i umożliwić osadzenie się aktywowanego szlamu. Zebrać supernatan, nalać dwie litry wody testowej, mieszać przez 15 minut i umożliwić ponowne osadzenie się szlamu. Po ponownym zebraniu supernatanu, należy użyć pozostały szlam w celu powtórzenia badania z tym samym materiałem testowym zgodnie z 1.6.1.4 i 1.6.2 powyżej. Można również wyizolować aktywny szlam przez odwirowanie zamiast osadzenia.

Dostosowany szlam można zmieszać ze świeżym szlamem w celu uzyskania stężenia o zawartości 0,2–1 g suchej masy/litr.

Środki analityczne

Zazwyczaj próbki filtrowane są przez starannie umyty filtr papierowy (do mycia należy użyć wodę dejonizowaną).

Próbki, które wciąż pozostają mętne, należy filtrować przez filtry membranowe (0,45 μm).

Stężenie DOC ustala się dwukrotnie na podstawie filtrowanej próbki (pierwsze 5 ml należy odrzucić) za pomocą przyrządu TOC. Jeżeli nie można dokonać analizy filtratu w tym samym dniu, należy przechować go w chłodziarce do następnego dnia. Nie zaleca się dłuższego okresu przechowywania.

Stężenie DOC ustala się w filtratach próbki za pomocą analitycznego określenia COD na podstawie procedury ustalonej w odnośniku (2), poniżej.

2. DANE I ANALIZA

Stężenia DOC i/lub COD ustala się co najmniej dwukrotnie w próbkach zgodnie z 1.6.2, powyżej. Degradacja w czasie T obliczana jest zgodnie ze wzorem (z definicjami) podanym zgodnie z 1.2, powyżej.

Stopień degradacji zaokrąglany jest do najbliższej wartości procentowej. Stopień degradacji uzyskany po zakończeniu badania odnotowywany jest jako „Biodegradacja w teście Zahn – Wellens".

Uwaga: W przypadku uzyskania całkowitej degradacji przed zakończeniem okresu badania, oraz gdy taki wynik potwierdzony jest drugą analizą przeprowadzoną w dniu następnym, wówczas badanie może zostać zakończone.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— początkowe stężenie substancji testowej,

— wszelkie inne informacje oraz wyniki badań dotyczące substancji testowej, substancji odniesienia jeżeli zostały użyte, i próbki ślepej,

— stężenie po trzech godzinach,

— krzywa biodegradacji wraz z opisem,

— data i lokalizacja pobrania próbek badanych organizmów, status dostosowania, użyte stężenie itd.,

— naukowe powody jakichkolwiek zmian procedury badania.

3.2. Interpretacja wyników

Ubytek DOC (COD) stopniowo następujący przez okres badania obejmujący dni lub tygodnie, wskazuje, iż substancja testowa ulega biodegradacji.

Jednakże fizyko-chemiczna adsorpcja może w niektórych przypadkach odegrać istotną rolę, a sygnalizowane jest to w przypadku całkowitego lub częściowego ubytku początkowego w ciągu pierwszych trzech godzin, a różnica między grupą kontrolną i badanymi supernatanami pozostaje na niespodziewanie niskim poziomie.

Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań jeżeli istnieje potrzeba rozróżnienia między biodegradacją (lub częściową biodegradacją) a adsorpcją.

Można to osiągnąć na wiele sposobów, ale najbardziej przekonujące jest użycie supernatantu lub szlamu jako inokulum w teście podstawowym (najlepiej teście respirometrycznym).

Substancje testowe powodujące wysoki, nieadsorpcyjny ubytek DOC (COD) w niniejszym badaniu należy uważać za substancje wpływające biodegradacyjnie. Częściowy, nieadsorpcyjny ubytek oznacza, iż substancja chemiczna ulega biodegradacji co najmniej w pewnym stopniu. Niski, lub zerowy poziom ubytku DOC (COD) może być spowodowany zahamowaniem aktywności drobnoustrojów przez substancję testową, co można również wykryć przez rozpad lub utratę szlamu, dającego mętne supernatany. Badanie należy powtórzyć wykorzystując niskie stężenie substancji testowej.

Użycie specyficznej dla danego związku metody analitycznej lub substancji testowej znakowanej izotopem węgla ^{14}C zwiększa czułość metody. W przypadku związków znakowanych ^{14}C, odzyskanie $^{14}CO_2$ potwierdzi, że zaszła biodegradacja.

W przypadku podawania wyników początkowej biodegradacji, jeżeli możliwe, należy wyjaśnić zmianę w budowie chemicznej, która powoduje utratę reakcji macierzystej substancji testowej.

Potwierdzenie metody analitycznej musi być dostarczone wraz z reakcją, która zaszła w próbce ślepej.

4. **ODNIESIENIA**

1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania* 201, decyzja Rady C(81) 30 ostateczna.

2) Załącznik V C.9 Degradacja: Chemiczne zapotrzebowanie tlenu, dyrektywa Komisji 84/449/EWG, *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich, nr* L 251, z 19.9.1984.

Dodatek

PRZYKŁAD ANALIZY

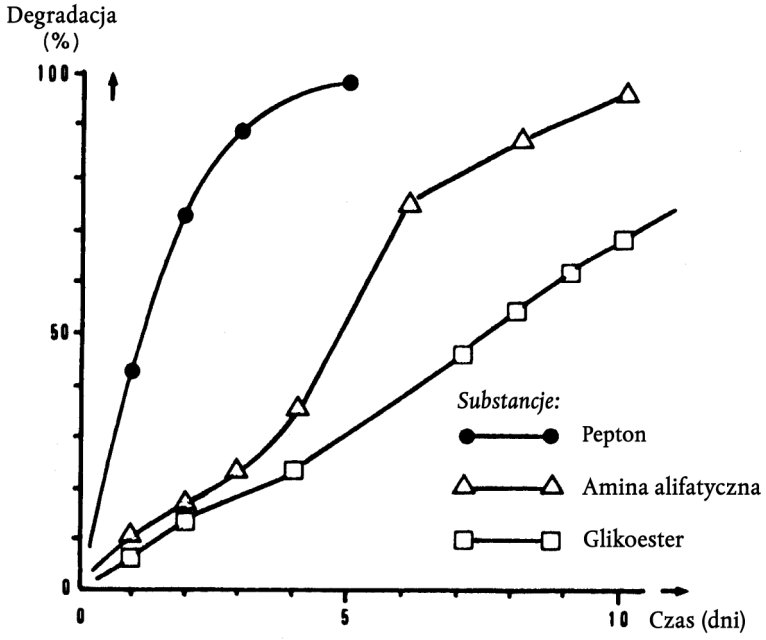
Związek organiczny:	4-kwas etoksybenzoesowy
Teoretyczne stężenie substancji testowej:	600 mg/l
Teoretyczne DOC:	390 mg/1
Inokulum	Oczyszczalnia ścieków z…
Stężenie:	1 gram suchej masy/litr
Poziom dostosowania:	Niedostosowany
Analiza:	Ustalenie DOC
Ilość próbki:	3 ml
Substancja kontrolna:	Dietylenoglikol
Toksyczność związku chemicznego:	Brak skutków toksyczności poniżej 1000 mg/1 Użyty test: Test probówkowy fermantacji

Czas badania	Substancja kontrolna				Substancja testowa		
	Próba ślepa DOC [1] mg/l	DOC [1] mg/l	DOC netto mg/1	Degradacja %	DOC [1] mg/l	DOC netto mg/1	Degradacja %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 godziny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dzień	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dni	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dni	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dni	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dni	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dni	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dni,	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

[1] Średnie wartości potrójnych degradacji.

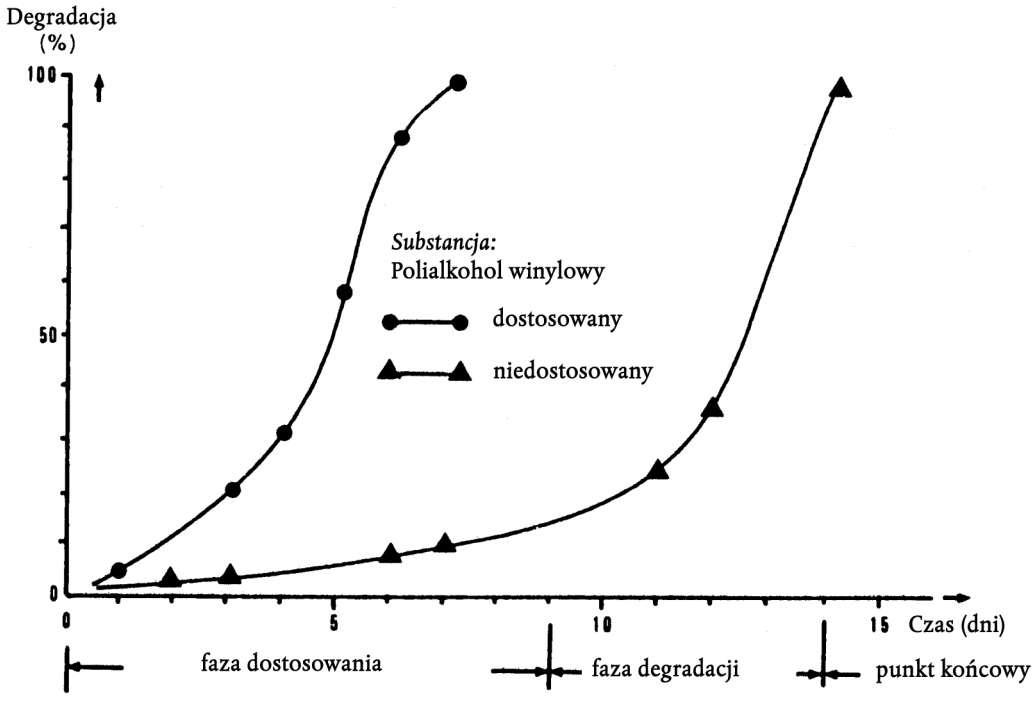
Wykres 1

Przykłady krzywych biodegradacji



Wykres 2

Przykłady dostosowania szlamu



BIODEGRADACJA

BADANIA SYMULACJI AKTYWOWANYCH SZLAMÓW

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

1.1.1. *Uwagi ogólne*

Metodę stosuje się jedynie w odniesieniu do tych substancji organicznych, które przy wielkości stężenia używanego w badaniu:

— są rozpuszczalne w wodzie w stopniu koniecznym do przygotowania roztworów testowych,

— posiadają nieznaczne ciśnienie pary w warunkach badania,

— nie hamują bakterii.

Informacje dotyczące względnych proporcji głównych składników materiału testowego będą użyteczne przy interpretacji otrzymanych wyników, w szczególności w tych przypadkach, gdzie wyniki są na niskim poziomie lub marginalne.

Pożądane są informacje dotyczące wpływu toksyczności substancji na drobnoustroje w celu dokonania interpretacji wyników o niskim poziomie oraz wyboru właściwych wielkości stężeń.

1.1.2. *Ustalenie całkowitej biodegradacji (analizy DOC/COD)*

Celem metody jest ustalenie całkowitej biodegradacji przez pomiar stopnia ubytku substancji i jakichkolwiek metabolitów w modelu zakładu oczyszczającego ścieki przez aktywowane szlamy przy stężeniu odpowiadającym > 12 mg DOC/litr (lub około 40 mg COD/litr); 20 mg DOC/litr wydaje się być optymalne. (DOC = rozwiązany węgiel organiczny; COD = chemiczne zapotrzebowanie tlenu).

Należy ustalić skład węgla organicznego (lub chemiczne zapotrzebowanie tlenu) materiału testowego.

1.1.3. *Ustalenie początkowej biodegradacji (analizy szczególne)*

Celem metody jest ustalenie początkowej biodegradacji substancji w modelu zakładu oczyszczającego ścieki przez aktywowane szlamy, przy stężeniu w wysokości około 20 mg/litr, wykorzystując szczególną metodę analityczną (można wykorzystać niższe lub wyższe stężenie, jeżeli zezwala na to metoda analityczna i stężenie toksyczności). Powyższe pozwala na oszacowanie początkowej biodegradacji substancji (zanik macierzystej budowy chemicznej).

Celem niniejszej metody nie jest ustalenie mineralizacji substancji testowej.

Wymagana jest dostępność do odpowiedniej metody analitycznej w celu ustalenia substancji testowej.

1.2. **Definicje i jednostki**

1.2.1. *Analizy DOC/COD*

Stopień ubytku substancji podawany jest przez:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\ \% \qquad [1(a)]$$

gdzie:

DR = procentowy stopień ubytku substancji DOC (lub COD) w danym średnim czasie retencji odnoszącym się do materiału testowego,

T = stężenie materiału testowego w cieczy wpływającej do zbiornika w mg DOC/litr (lub mg COD/litr),

E = stężenie DOC (lub COD) w cieczy wypływającej ze zbiornika w jednostce testowej w mg DOC/litr (lub mg COD/litr),

E_o = stężenie DOC (lub COD) w cieczy wypływającej ze zbiornika w próbce ślepej w mg DOC/litr (lub mg COD/litr).

Degradację stwierdza się jako procent ubytku DOC (lub COD) w danym czasie retencji w odniesieniu do materiału testowego.

1.2.2. *Analizy szczególne*

Procentowe wydzielenie testowej substancji z fazy wodnej (R_w) w danym średnim czasie retencji wyrażone jest przez:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

gdzie:

C_i = stężenie substancji w cieczy wpływającej do zbiornika w jednostce testowej (mg substancji/litr, ustalone na podstawie analiz szczególnych),

C_o = stężenie substancji w cieczy wypływającej ze zbiornika w jednostce testowej (mg substancji/litr, ustalone na podstawie analiz szczególnych),

1.3. **Substancje odniesienia**

W niektórych przypadkach podczas badania nowych substancji użyteczne mogą okazać się substancje odniesienia; jednakże nie można jeszcze zalecić szczególnych substancji odniesienia.

1.4. **Zasada metody badawczej**

W celu określenia całkowitej biodegradowalności, należy równolegle uruchomić dwie pilotowe jednostki szlamu aktywowanego (test potwierdzający OECD lub jednostki porowatego wkładu). Substancja testowa dodawana jest do cieczy wpływającej do zbiornika (ściek syntetyczny lub wewnętrzny) jednej z jednostek, podczas gdy druga jednostka otrzymuje czysty ściek. W celu określenia podstawowej biodegradowalności, ze analizą szczególną cieczy wpływającej do i wypływającej ze zbiornika, należy użyć tylko jednej jednostki.

Dokonywany jest pomiar stężeń DOC (lub COD) w cieczach wypływających ze zbiornika, lub stężenia substancji ustalane są w oparciu o analizy szczególne.

Ze względu na materiał testowy nie dokonuje się pomiaru DOC, ale jedynie oznacza jego wartość.

W przypadku przeprowadzania pomiarów DOC (lub COD), zakłada się, iż różnica średnich stężeń między cieczami testowymi wypływającymi ze zbiornika a kontrolnymi cieczami wypływającymi ze zbiornika spowodowana jest brakiem degradacji materiału testowego.

W przypadku przeprowadzania szczególnych analiz, można dokonać pomiaru stężenia molekuły macierzystej. (biodegradacja podstawowa).

Jednostki mogą być eksploatowane zgodnie z trybem jednostek połączonych, zgodnie z metodą transinokulacji.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Początkowe stężenie substancji zależy od rodzaju przeprowadzonej analizy i jej ograniczeń.

1.6. **Opis metody badawczej**

1.6.1. *Przygotowanie*

1.6.1.1. Urządzenia

Wymagane są dwie jednostki tego samego rodzaju, z wyjątkiem przypadków gdy przeprowadzane są analizy szczególne.

Można użyć dwa rodzaje jednostek:

Test potwierdzający OECD

Sprzęt (dodatek l1) składa się ze zbiornika (A) do magazynowania ścieków syntetycznych, pompy dozującej (B), zbiornika napowietrzającego (C), osadnika (D), powietrznego podnośnika cieczy (E), do zwracania do obiegu aktywnego szlamu i naczynia (F) do zbierania poddawanych procesowi cieczy wypływających ze zbiornika.

Zbiorniki (A) i (F) muszą być wykonane ze szkła lub odpowiedniego tworzywa sztucznego o objętości co najmniej 24 litrów. Pompa (B) musi zapewniać stały przepływ syntetycznego ścieku do napowietrzanego zbiornika; użyć można każdy odpowiedni system po warunkiem, że zapewniony zostanie przepływ i stężenie. W trakcie zwyczajnej eksploatacji wysokość osadnika (D) ustalona jest w taki sposób, aby jego objętość zawarta w napowietrzanym zbiorniku wynosiła trzy litry zmieszanego płynu. Spiekana kostka napowietrzania (G) jest zawieszana w zbiorniku (C) na wierzchołku stożka. Ilość powietrza wdmuchiwanego przez napowietrzacz może być mierzona przy użyciu przepływomierza.

Powietrzny podnośnik cieczy (E) jest umieszczony w taki sposób, że aktywny szlam z osadnika jest nieustannie i regularnie zwracany do zbiornika napowietrzającego (C).

„Porowaty wkład"

Porowaty wkład wykonany jest z płyt porowatego polietylenu (o grubości 2 mm, maksymalny rozmiar pory 95 urn), które tworzą walce o średnicy 14 cm o stożkowej podstawie 45° (rysunek 1 i 2 dodatku 2). Porowaty wkład jest zawarty w nieprzepuszczalnym zbiorniku wykonanym z odpowiedniego plastiku o średnicy wylotu 15 cm oraz wysokości 17,2 cm części walcowatej, co określa objętość (3 litrów) w naczyniu. Na szczycie wewnętrznego zbiornika znajduje się sztywna wspierająca opaska wykonana z odpowiedniego tworzywa sztucznego w taki sposób, aby powstała przestrzeń cieczy wypływającej ze zbiornika, wynosząca 0,5 cm między zbiornikiem wewnętrznym a zewnętrznym.

Porowaty wkład można zamocować u podstawy termostatycznie kontrolowanej kąpieli wodnej. Powietrze dostarczane jest do podstawy wewnętrznego zbiornika, na której umieszczone są odpowiednie dyfuzory.

Zbiorniki (A) i (E) muszą być wykonane ze szkła lub odpowiedniego tworzywa sztucznego i muszą posiadać objętość 24 litrów. Pompa (B) musi zapewniać stały przepływ syntetycznego ścieku do napowietrzanego zbiornika; użyć można każdy odpowiedni system, po warunkiem że zapewniony zostanie przepływ i stężenie.

Wymagane są zapasowe wewnętrzne porowate wkłady w celu zastąpienia jakichkolwiek naczyń, które mogą zostać zablokowane w trakcie używania; zablokowane naczynia należy oczyścić przez 24-godzinne zanurzenie w roztworze podchlorynu po gruntownym umyciu bieżącą wodą.

1.6.1.2. Filtracja

Urządzenia do filtracji membranowej i filtry membranowe o rozmiarach porów 0,45 μm. Filtry membranowe są odpowiednie, jeżeli zostanie potwierdzone, że nie uwalniają węgla ani nie absorbują substancji w fazie filtracji.

1.6.1.3. Ścieki

Każda odpowiednia syntetyczna pożywka lub wewnętrzne ścieki mogą zostać użyte do badania.

Przykład syntetycznej pożywki

Rozpuszczenie w każdym litrze wody bieżącej:

Pepton:	160 mg,
Ekstrakt z mięsa:	110 mg,
Karbamid:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg,
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Ścieki wewnętrzne

Świeże ścieki należy zebrać każdego dnia z przepływowego odstojnika podstawowego w oczyszczalni ścieków, oczyszczającej w przeważającej mierze ścieki wewnętrzne.

1.6.1.4. Roztwór podstawowy materiału testowego

Należy przygotować roztwór materiału testowego, np. 1 %, celem dodania do jednostki testowej. Należy ustalić stężenie materiału w celu poznania właściwej objętości materiału mającego być dodanym do ścieków lub bezpośrednio do jednostki przez drugą pompę dla uzyskania wymaganego stężenia.

1.6.1.5. Inokulum

Uwagi: W przypadku wykorzystania wewnętrznych ścieków, bezcelowe byłoby użycie inokulum o niskim stężeniu bakteryjnym, ale wykorzystać można aktywowany szlam.

Zastosować można odmianę inokulum.

Podaje się trzy przykłady odpowiedniego inokulum:

a) Inokulum pochodzące z cieczy powtórnie opuszczającej zbiornik

Inokulum należy uzyskać z wtórnej cieczy wypływającej ze zbiornika o dobrej jakości zebranej z oczyszczalni ścieków oczyszczającej przeważnie ścieki wewnętrzne. Ciecze wypływające ze zbiornika należy przetrzymywać w warunkach tlenowych w okresie między zebraniem a zastosowaniem. W celu przygotowania inokulum próbka jest filtrowana przez gruboziarnisty filtr, a pierwsze 200 ml filtratu należy odrzucić. Filtrat należy przechowywać w warunkach tlenowych aż do chwili jego użycia. Inokulum należy użyć w dniu jej zebrania. Do szczepienia należy użyć co najmniej 3 ml inokulum.

b) Inokulum łączne

Inokulum z wtórnej cieczy wypływającej ze zbiornika:

patrz opis powyżej.

Inokulum z gleby:

100 g gleby ogrodowej (żyznej, niesterylnej) zawieszone jest w 1000 ml bezchlorowej wody pitnej. (Gleby o znacznej frakcji iłowej, piasek lub próchnica są nieodpowiednie). Po wymieszaniu zawiesina osiada przez okres 30 minut. Supernatan filtrowany jest przez gruboziarnistą bibułę filtracyjną, pierwsze 200 ml należy odrzucić. Należy rozpocząć natychmiastowe napowietrzanie filtratu aż do chwili jego użycia. Inokulum należy użyć w dniu jej zebrania.

Inokulum z wody powierzchniowej:

Następne częściowe inokulum uzyskiwane jest z mezosaprobicznej wody powierzchniowej. Próbka filtrowana jest przez gruboziarnisty papier, pierwsze 200 ml należy odrzucić. Filtrat należy przechowywać w warunkach tlenowych aż do chwili jego użycia. Inokulum należy użyć w dniu zebrania.

Równe wielkości trzech częściowych próbek inokulum są łączone i dokładnie mieszane, ostateczne inokulum uzyskiwane jest z powstałej mieszaniny. Do inokulacji należy użyć co najmniej 3 ml inokulum.

c) Inokulum z aktywnego szlamu

Jako inolukum można użyć pewnej ilości (nie więcej niż 3 litry) aktywowanego szlamu (zawieszona sucha masa do 2,5 g/litr) pobranego ze zbiornika napowietrzającego w oczyszczalni ścieków, w przeważającej mierze oczyszczającej ścieki wewnętrzne.

1.6.2. *Procedura*

Badanie przeprowadzane jest w temperaturze pokojowej; temperaturę należy utrzymywać w przedziale 18–25 °C.

Odpowiednio do potrzeb, badanie można przeprowadzić w niższej temperaturze (do 10 °C); w przypadku degradacji substancji, dalsze badanie nie jest konieczne. Jednakże w przypadku gdy substancja nie ulegnie degradacji, badanie należy przeprowadzić przy stałej temperaturze między 18 a 25 °C.

1.6.2.1. Okres eliminacji: tworzenie szlamu/stabilizacja jednostek

Okres wzrostu/stabilizacji szlamu jest okresem, w którym stężenie zawieszonej suchej masy aktywnego szlamu oraz wydajność jednostek rozwija się do stanu stałego w zastosowanych warunkach działalności.

Okres eliminacji to okres, który trwa od chwili pierwszego dodania substancji testowej do czasu, gdy jej ubytek osiągnie plateau (względnie stałą wartość). Okres nie może przekroczyć sześciu tygodni.

Okres analizy wynosi trzy tygodnie od chwili, gdy ubytek substancji testowej osiągnie względnie stałą, i zazwyczaj wysoką wartość. Dla tych substancji, które nie wykazują degradacji lub wykazują znikomą degradacje w pierwszych sześciu tygodniach, okres analizy przyjmuje się jako kolejne trzy tygodnie.

Początkowo należy napełnić jednostkę (jednostki) inokulum wymaganym do przeprowadzenia jednego badania i zmieszanym z cieczą wpływającą do zbiornika.

Następnie należy zainstalować napowietrzacz (i powietrzny podnośnik cieczy (E) w przypadku jednostek testu potwierdzającego OECD) oraz jednostkę dozującą (B).

Ciecz wpływająca do zbiornika bez substancji testowej musi przechodzić przez napowietrzane naczynie (C) w tempie jednego litra na godzinę albo w tempie półtorej litra na godzinę; pozwala to uzyskać średni czas retencji wynoszący trzy lub sześć godzin.

Tempo napowietrzania należy regulować w taki sposób, aby zawartość zbiornika (C) utrzymywana była stale w zawieszeniu, podczas gdy zawartość rozpuszczonego tlenu wynosi co najmniej 2 mg/litr.

Wytwarzanie piany należy powstrzymać właściwymi środkami. Nie wolno używać środków przeciwpieniących, które hamują działanie szlamu aktywowanego.

Szlam nagromadzony wokół wylotu zbiornika napowietrzającego (C) (i, w przypadku jednostek testu potwierdzającego OECD, u podstawy osadnika (D), oraz w obiegu) musi zostać ponownie dodany do zmieszanego płynu co najmniej raz dziennie przez zeszczotkowanie lub w inny właściwy sposób.

Kiedy szlamu nie udaje się oddzielić, jego gęstość można zwiększyć przez dodanie porcji 2 ml 5 % roztworu chlorku żelaza, powtarzane w razie potrzeby.

Ciecz wypływająca ze zbiornika zbierana jest w zbiorniku (E lub F) przez 20–24 godzin, a próbka pobierana jest po całkowitym wymieszaniu. Zbiornik (E lub F) należy dokładnie oczyścić.

W celu monitorowania i kontroli wydajności procesu, dokonuje się pomiaru chemicznego zapotrzebowania tlenu (COD) lub rozwiązanego węgla organicznego (DOC), filtratu nagromadzonej cieczy wypływającej ze zbiornika co najmniej dwa razy w tygodniu, a także przefiltrowanej cieczy wpływającej do zbiornika (używając membrany o wielkości poru 0,45 μm, pierwsze 20 ml (około) filtratu należy odrzucić).

Obniżenie wartości COD lub DOC powinno się ustabilizować w chwili uzyskania w miarę regularnej dziennej wartości degradacji.

Zawartość suchej masy aktywowanego szlamu w zbiorniku napowietrzającym powinna być określana dwa razy w tygodniu. Jednostki mogą działać na jeden lub dwa sposoby: należy ustalić zawartość suchej masy w aktywnym szlamie dwa razy w tygodniu, i, jeżeli niniejsza zawartość wyniesie więcej niż 2,5 g/litr, nadwyżka aktywnego szlamu musi zostać odrzucona, albo 500 ml zmieszanego płynu usuwana jest z każdego naczynia raz dziennie w celu otrzymania średniego czasu retencji szlamu wynoszącego sześć dni.

W przypadku gdy parametry pomiarowe i szacowane (wydajność procesu (odnośnie do usuwania COD lub DOC), stężenie szlamu, oddzielanie się szlamu, mętność cieczy wypływających ze zbiorników itd.) dwóch jednostek są dostatecznie stabilne, substancję testową można wprowadzić do cieczy wpływającej do jednej z jednostek, zgodnie z 1.6.2.2.

Ewentualnie substancję testową można dodać na początku okresu wzrostowego szlamu (1.6.2.1), w szczególności gdy szlam dodawany jest jako inokulum.

1.6.2.2. Procedura badawcza

Należy utrzymywać warunki działania w okresie eliminacji oraz należy dodawać odpowiedni roztwór podstawowy (około 1 %) materiału testowego do cieczy wpływającej do jednostki testowej w celu otrzymania pożądanego stężenia materiału testowego (w przybliżeniu 10–20 mg DOC/litr lub 40 mg COD/litr) w ścieku. Powyższe można otrzymać przez codzienne wmieszanie roztworu podstawowego do ścieków lub przez oddzielny system pompowania. Właściwe stężenie można otrzymać stopniowo. W przypadku braku wystąpienia skutków oddziaływania toksyczności substancji testowej na aktywowany szlam, można również przeprowadzić badanie wyższych stężeń.

Do jednostki z próbką ślepą wprowadza się jedynie ciecz wpływającą do zbiornika bez dodanych substancji, pobierane są odpowiednie wielkości cieczy wypływających ze zbiorników do analizy i filtrowane przez filtry membranowe (0,45 μm) odrzucając (około) 20 ml pierwszego filtratu.

Przefiltrowane próbki muszą zostać przeanalizowane w tym samym dniu, w przeciwnym razie muszą być przechowane odpowiednią metodą, na przykład przez użycie 0,05 ml 1 % roztworu chlorku rtęciowego ($HgCl_2$) dla każdego 10 ml filtratu lub przez przechowanie ich w temperaturze 2–4 °C przez okres nie dłuższy niż 24 godziny, lub poniżej -18 °C przez dłuższe okresy czasu.

Okres eliminacji, z dodatkiem substancji testowej, nie powinien przekraczać sześciu tygodni, a okres analizy nie powinien być krótszy niż trzy tygodnie, tj., około 14–20 oznaczeń powinno zostać dokonane w celu obliczenia wyników końcowych.

Tryb jednostek połączonych

Połączenie jednostek można osiągnąć przez wewnętrzną wymianę 1,5 litra zmieszanego płynu (włączając szlam) z napowietrzanego zbiornika aktywnego szlamu między dwiema jednostkami raz dziennie. W przypadku silnie absorbującego materiału testowego, jedynie 1,5 litra supernatanu pobierane jest z osadnika i wlewane do zbiornika z aktywowanym szlamem w drugiej jednostce.

1.6.2.3. Analiza

Przeprowadzić można dwa rodzaje analizy w celu obserwacji zachowania substancji:

DOC i COD

Analizę stężenia DOC przeprowadza się dwukrotnie za pomocą analizatora węglowego i/lub wartości COD zgodnie z odniesieniem (2).

Szczególne analizy

Stężenia substancji testowej ustala się za pomocą odpowiedniej metody analitycznej. Jeżeli to możliwe, należy dokonać szczególnego ustalenia absorpcji substancji przez szlam.

2. DANE I OSZACOWANIE

2.1. Tryb jednostek połączonych

W przypadku wykorzystania „trybu jednostek połączonych", dzienny stopień ubytku substancji, GRD oblicza się zgodnie z 1.2.1.

Te dzienne stopnie usunięcia GRD są korygowane względem DRc, dla transferu materiału spowodowanego procedurą transinokulacji zgodnie z równaniem [2] dla trzygodzinnego średniego czasu retencji lub równaniem [3] dla czasu sześciogodzinnego.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Obliczana jest średnia serii wartości DRc, a ponadto zgodnie z równaniem [4], obliczane jest odchylenie standardowe

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DRc_i\right)^2}{n - 1}} \quad [4]$$

gdzie:

s_{DRc} = odchylenie standardowe serii wartości DRc,

$D\overline{R}$ = średnia wartości DRc,

n = liczba okrążeń.

Oddzielne wartości serii DRc są eliminowane zgodnie z odpowiednią procedurą statystyczną, np. Nalimova (6), przy 95 % stopniu prawdopodobieństwa i średnia wartość oraz odchylenie standardowe wartości DRc (wolnej od wartości oddzielnych) są obliczane ponownie.

Następnie końcowe wyniki obliczane są za pomocą równania [5], jako:

$$DRc = D\overline{R} \pm \frac{t_{n-1}; \alpha}{\sqrt{n}} s_{DRc} \quad [5]$$

gdzie:

t_{n-1}; α = wartość tablicowa t dla n wartości par E i E_O i pewnością statystyczną P (P = 1 – a) gdy wartość P = 95 % (1).

Wynik podany jest jako średnia z granicami tolerancji o poziomie prawdopodobieństwa 95 %, odpowiednie odchylenie standardowe oraz liczba danych z zestawu wartości DRc wolnych od wartości oddzielnych, oraz liczba wyników odbiegających, np.

DRc = 98,6 ± 2,3 % ubytku DOC,

s = 4,65 % ubytku DOC,

n = 18,

x = liczba wyników odbiegających.

2.2. **Tryb jednostek oddzielnych**

Wydajność jednostek testowych można sprawdzić w następujący sposób:

$$\text{Procent ubytku COD lub DOC} = \frac{\text{COD lub DOC ścieków} - \text{COD lub DOC szlamu}}{\text{ścieki COD lub DOC}} \times 100$$

Dzienna wartość usunięć może zostać graficznie zapisana w celu wykazania wszelkich tendencji np., tendencji do aklimatyzacji.

2.2.1. *Użycie ustaleń wartości COD/DOC*

Dzienna wartość stopnia usunięcia GRD jest obliczana zgodnie z 1.2.1.

Obliczana jest średnia serii wartości GRD; ponadto jej odchylenie standardowe oblicza się zgodnie z:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DR_i\right)^2}{n - 1}} \quad [6]$$

gdzie:

S_{GRD} = odchylenie standardowe serii wartości GRD_i,

$D\overline{R}$ = średnia wartości GRD_i,

n = liczba okrążeń.

Oddzielne wartości serii DRc są eliminowane zgodnie z odpowiednią procedurą statystyczną, np. Nalimova (6), przy 95 % stopniu prawdopodobieństwa i średnia wartość oraz odchylenie standardowe wartości DRc (wolnej od wartości oddzielnych) są obliczane ponownie.

Końcowe wyniki obliczane są za pomocą równania [7], jako:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}s_{DR}} \quad [7]$$

gdzie:

t_{n-1}; α = wartość tablicowa t dla n wartości par E i E_O i pewnością statystyczną P (P = 1 – a) gdy wartość P = 95 % (1).

Wynik podany jest jako średnia z granicami tolerancji o poziomie prawdopodobieństwa 95 %, odpowiednie odchylenie standardowe oraz liczba danych z zestawu wartości DRc wolnych od wartości oddzielnych, oraz liczba wyników odbiegających, np.

DR = (98,6 ± 2,3)% ubytku DOC,

s = 4,65 % ubytku DOC,

n = 18,

x = liczba wyników odbiegających.

2.2.2. *Wykorzystanie szczególnych analiz*

Procent wydalenia substancji testowej z fazy wodnej (R_W) obliczany jest zgodnie z 1.2.2.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— formularz podany w dodatku 3, zawierający warunki działań badawczych,

— rodzaj wybranych urządzeń (test potwierdzający OECD lub porowaty wkład),

— rodzaj wybranego trybu działania: tryb jednostek połączonych lub oddzielnych,

— rodzaj ścieku: syntetyczny lub wewnętrzny – w przypadku ścieków wewnętrznych, data i lokalizacja próbki,

— rodzaj inokulum, data i lokalizacja próbki,

— deklaracja wraz z opisem metody analitycznej w przypadku przeprowadzenia analiz szczególnych,

— wykres ubytku COD lub DOC względem czasu, włączając okres eliminacji i okres analizy,

— analityczna regeneracja substancji testowej jako COD wartości DOC w roztworze podstawowym,

— w przypadku przeprowadzenia szczególnych analiz, wykres procentowego ubytku substancji testowej z fazy wodnej względem czasu (okres eliminacji i okres analizy),

— średnia wartość ubytku DOC lub COD substancji testowej i odchylenie standardowe obliczane na podstawie wyników okresu analitycznego, tj. w przypadku gdy zachodzi stałe usuwanie materiału testowego lub okres równomiernego działania,

— wykres stężenia aktywowanego szlamu względem czasu,

— wszelkie uwagi dotyczące aktywnego szlamu (ilość odrzuconej nadwyżki szlamu, obecność pęcznienia, $FeCl_3$ itd.),

— stężenie substancji używanej w badaniu,

— wszelkie wyniki analiz przeprowadzonych na szlamie,

— wszelkie informacje oraz wyniki badania dotyczące substancji testowej i substancji odniesienia, jeżeli została użyta,

— naukowe powody jakichkolwiek zmian procedury.

3.2. **Interpretacja wyników**

Niska wartość ubytku substancji testowej z fazy wodnej może być spowodowana zahamowaniem aktywności drobnoustrojów przez substancję testową. Powyższe można również wykazać na podstawie rozpadu i utraty szlamu, dającego mętny supernatant, i przez spadek wydajności usuwania COD (lub DOC) jednostki pilotowej.

W niektórych przypadkach istotną rolę może odegrać absorpcja fizyko-chemiczna. Różnice między biologicznym działaniem na molekułę a adsorpcją fizyko-chemiczną można ujawnić w oparciu o przeprowadzone analizy szlamu po odpowiedniej desorpcji.

Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, jeżeli istnieje potrzeba rozróżnienia między biodegradacją (lub częściową biodegradacją) a adsorpcją.

Można to osiągnąć na wiele sposobów, ale najbardziej przekonujące jest użycie supernatantu lub szlamu jako inokulum w teście podstawowym (najlepiej teście respirometrycznym)

Jeżeli zaobserwowana jest wysoka wartość DOC lub COD, spowodowane jest to biodegradacją, podczas gdy przy niskich wartościach ubytku substancji, biodegradacji nie można odróżnić od wydalania substancji. Na przykład, jeżeli związek rozpuszczalny wykazuje wysoką stałą adsorpcję w wysokości 98 % i wskaźnik nadwyżki straty szlamu wynosi 10 % na dzień, możliwe jest wydzielenie do 40 %; przy wskaźniku nadwyżki straty szlamu w wysokości 30 %, wydzielenie z powodu adsorpcji i usunięci nadwyżki szlamu może wynieść do 65 % (4).

W przypadku wykorzystania analiz szczególnych należy zwrócić uwagę na powiązanie między strukturą substancji a zastosowaną analizą szczególną. W tym przypadku obserwowanego zjawiska nie można interpretować jako mineralizację substancji.

4. **ODNIESIENIA**

(1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania* 201, decyzja Rady C(81) 30 ostateczna.

(2) Załącznik V C.9 Degradacja: Chemiczne zapotrzebowanie tlenu, dyrektywa Komisji 84/449/EWG, *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich nr* L 251 z 19.9.1984.

(3) Painter, H.A., King, E.F., *WRC Metoda Porowatego Wkładu dla oznaczenia biodegradacji,* Raport Techniczny TR 70, czerwiec1978, Wodny Ośrodek Badawczy, Zjednoczone Królestwo.

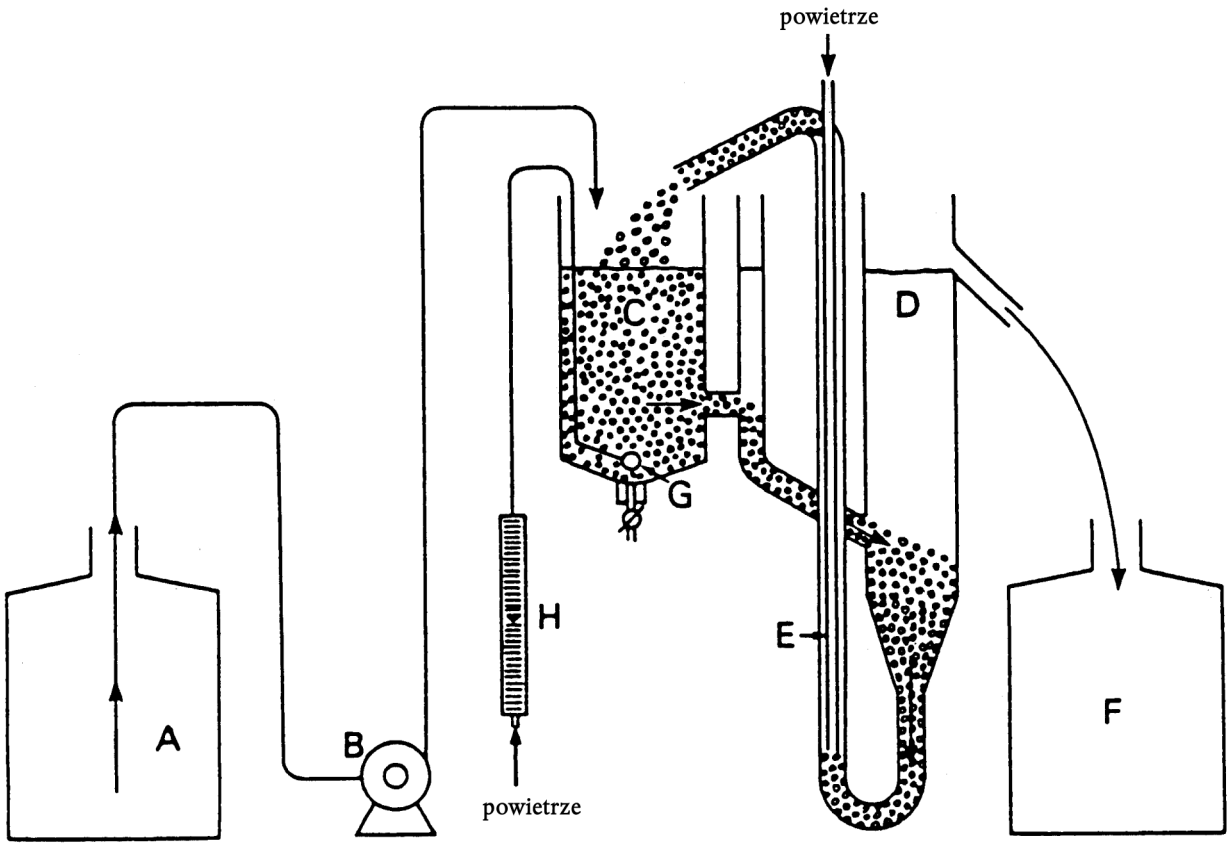
(4) Wierich, P., Gerike, P., Eliminacja związków rozpuszczalnych, opornych i adsorbujących w oczyszczalniach ścieków działających na zasadzie szlamów aktywowanych, *Ekotoksykologia i Bezpieczeństwo Środowiskowe,* tom 5, nr 2, czerwiec 1981, str. 161–171;

(5) Dyrektywy Rady 82/242/EWG i 82/243/EWG, *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L 109 z 22.4.1982, zmieniające dyrektywy Rady 73/404/EWG i 73/405/EWG w sprawie biodegradacji detergentów, *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich* L 347 z 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), str. 406–408;

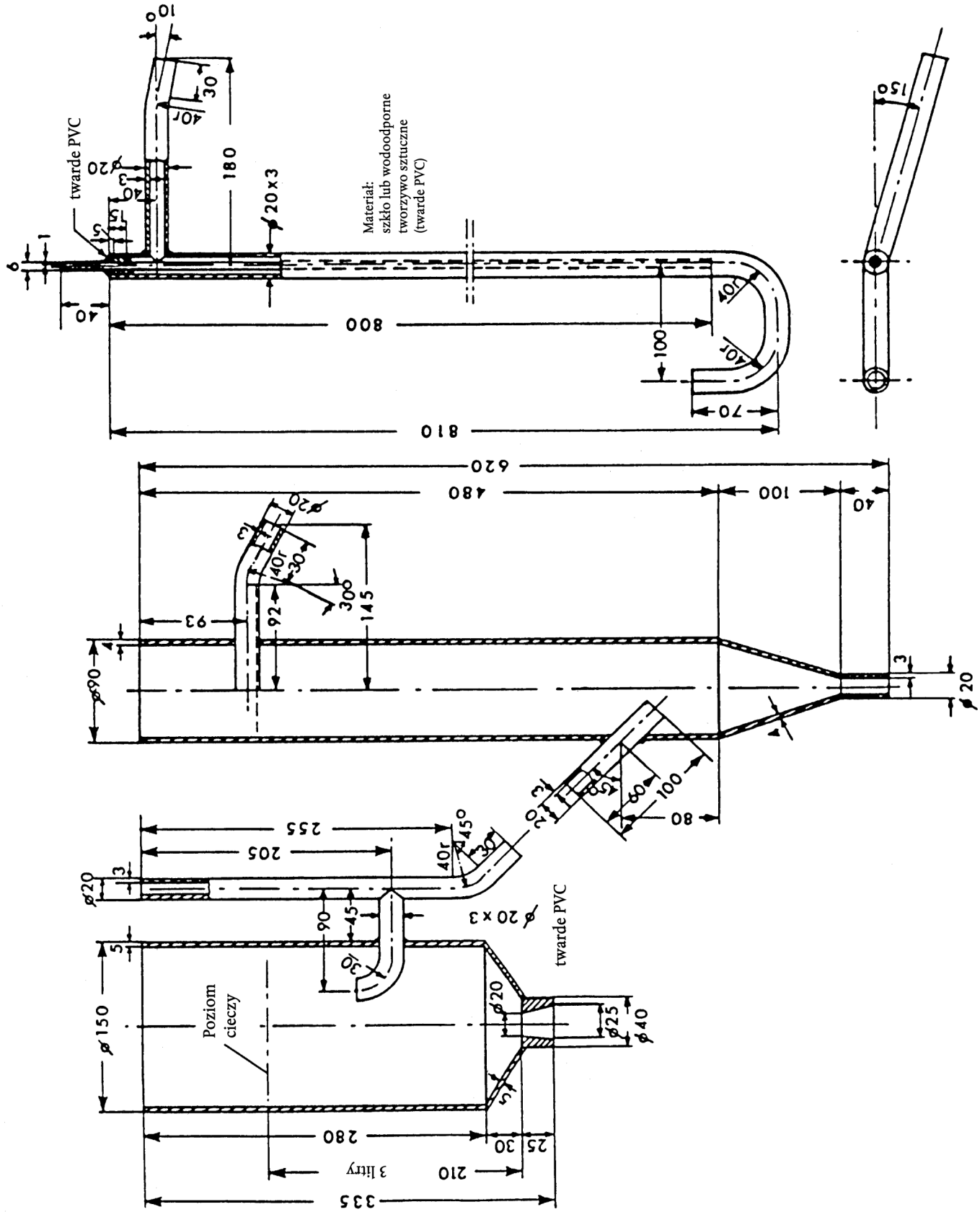
Dodatek 1

Rysunek 1



Klucz: A: naczynie zbiorcze;
B: urządzenie dozujące;
C: komora napowietrzania (3 l pojemności);
D: osadnik;
E: powietrzny podnośnik cieczy;
F: kolektor;
G: napowietrzacz;
H: przepływomierz (nieobowiązkowo).

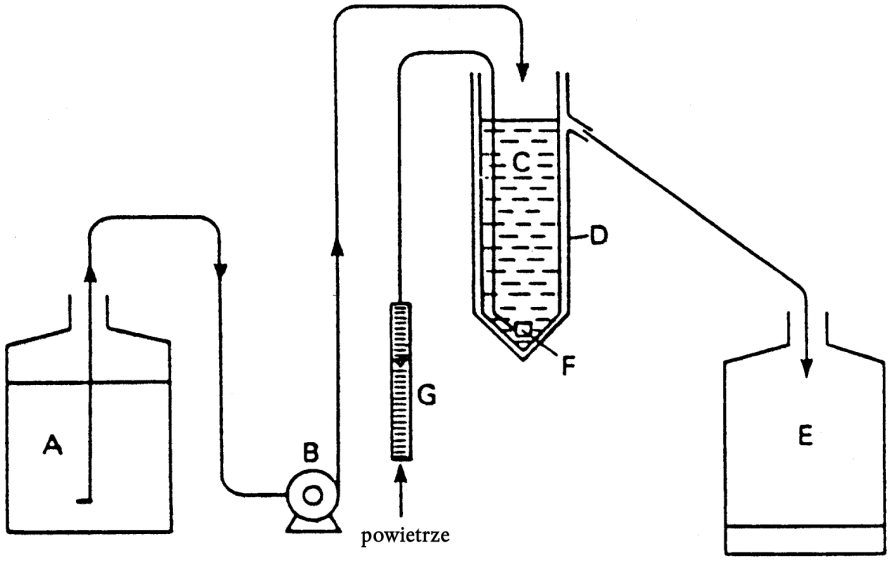
Rysunek 2


twarde PVC
Materiał:
szkło lub wodoodporne
tworzywo sztuczne
(twarde PVC)
Poziom
cieczy
3 litry
twarde PVC

Dodatek 2

Rysunek 1

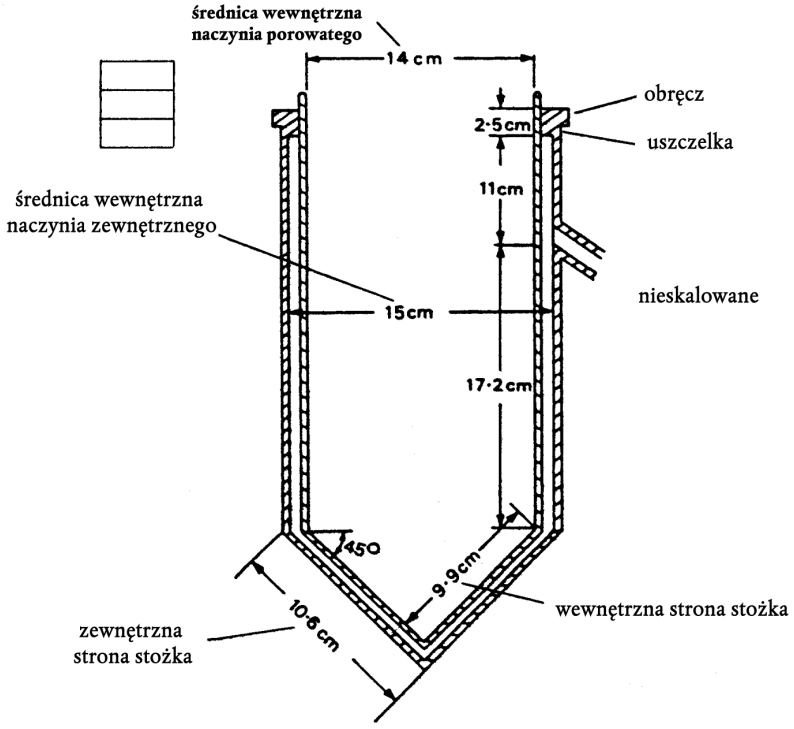
Sprzęt do określania stopnia biodegradacji



Klucz: A: naczynie zbiorcze;
B: pompa dozująca;
C: porowaty zbiornik napowietrzający;
D: nieprzepuszczalny zbiornik zewnętrzny;
E: zbiornik cieczy wypływających ze zbiorników;
F: kolektor;
G: fluorymetr gęstości (nieobowiązkowo).

Rysunek 2

Szczegółowy opis trzylitrowego porowatego naczynia napowietrzającego



Dodatek 3

Warunki działalności w badaniu symulacji aktywnego szlamu

Kontrola w każdej grupie

Urządzenia

Test potwierdzający OECD ☐
Naczynie porowate ☐

Tryb działania

Pojedyncza jednostka ☐
Połączone jednostki ☐
Jednostki oddzielne ☐

Transinokulacja

Brak ☐
Aktywowany szlam ☐
Supernatan ☐

Średni czas retencji

Trzy godziny ☐
Sześć godzin ☐

Pożywka podstawowa

Ścieki wewnętrzne ☐
Ścieki syntetyczne ☐

Inokulum

Wtórne ciecze wypływające ze zbiornika ☐
Kompozyt ☐
Aktywny szlam ☐

Dodawanie materiału testowego

Od rozpoczęcia badania ☐
Stopniowy wzrost ☐
Po uformowaniu się szlamu ☐

Analiza

Szczególna ☐
COD ☐
DOC ☐

BIODEGRADACJA

BADANIE HAMOWANIA ODDYCHANIA AKTYWOWANYCH SZLAMÓW

1. METODA

1.1. Wstęp

Opisana metoda ocenia skutki wpływu substancji testowej na drobnoustroje, przez dokonywanie pomiaru stopnia oddychania w określonych warunkach w obecności różnych stężeń substancji testowej.

Celem tej metody jest dostarczenie bardzo szybkiej metody badań, za pomocą której można zidentyfikować związki, które mogą mieć niekorzystny wpływ na florę bakterii aerobowych oczyszczalni, oraz wskazać odpowiednie, nieinhibujące stężenia substancji testowych, które mają być użyte w testach biodegradowalności.

Badanie ustalania wielkości stężeń może poprzedzać badanie ostateczne. Dostarcza ono informacji dotyczących zakresu wielkości stężeń mających być zastosowanymi w badaniu głównym.

Do projektu badania należy włączyć dwie grupy kontrolne bez substancji testowej, jedną w chwili rozpoczęcia badania i drugą po zakończeniu serii badań. Należy skontrolować każdą partię aktywowanego szlamu używając substancji odniesienia.

Niniejsza metoda łatwo stosuje się do substancji, które ze względu na ich rozpuszczalność w wodzie i niską lotność, mogą pozostać w wodzie.

W odniesieniu do substancji o ograniczonej rozpuszczalności w badanym środku, ustalenie EC_{50} może okazać się niemożliwe

Wyniki oparte na wchłanianiu tlenu mogą doprowadzić do błędnych wniosków, w przypadku gdy substancja testowa ma skłonność do rozszczepiania fosforylacji oksydacyjnej.

Przydatne jest posiadanie następujących informacji w celu przeprowadzenia badania:

— rozpuszczalność w wodzie,

— ciśnienie pary,

— wzór strukturalny,

— czystość substancji testowej.

Zalecenie

Aktywowany szlam może zawierać potencjalne organizmy chorobotwórcze i należy się z nim obchodzić ostrożnie.

1.2. Definicje i jednostki

Wskaźnik oddychania jest to zużycie tlenowe drobnoustrojów ściekowych w szlamie tlenowym, ogólnie wyrażane jako mg O_2 na mg. szlamu na godzinę.

W celu dokonania obliczeń hamującego wpływu substancji testowej przy danym stężeniu, wskaźnik oddychania wyrażony jest jako procent średniej z dwóch kontrolnych wskaźników oddychania.

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{Procent zahamowania}$$

gdzie:

R_S = wskaźnik zużycia tlenu przy badanym stężeniu substancji testowej,

Rc_1 = wskaźnik zużycia tlenu, grupa kontrolna 1,

Rc_2 = wskaźnik zużycia tlenu, grupa kontrolna 2.

W niniejszej metodzie EC_{50} jest stężeniem substancji testowej, przy którym wskaźnik oddychania wynosi 50 % wskaźnika wykazanego w grupie kontrolnej w warunkach opisanych w niniejszej metodzie.

1.3. **Substancje odniesienia**

Zaleca się użycie 3,5-dichlorofenolu, znanego inhibitora oddychania, jako substancji odniesienia i przeprowadzenie badania w celu ustalenia EC_{50} każdej partii aktywowanego szlamu jako środek kontrolny w celu oznaczenia nieprawidłowości w czułości szlamu.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Wskaźnik oddychania aktywowanego szlamu zasilonego standardową ilością ścieku syntetycznego mierzony jest po upływie kontaktowego czasu 30 minut lub trzech godzin, lub po upływie tych okresów czasu łącznie. Dokonuje się także pomiaru wskaźnika oddychania tego samego aktywowanego szlamu w obecności różnych stężeń substancji testowej w odmiennych warunkach. Hamujący wpływ substancji testowej o danym stężeniu jest wyrażony jako procent średnich wskaźników oddychania z dwóch grup kontrolnych. Wartość EC_{50} obliczana jest z ustaleń różnych stężeń.

1.5. **Kryteria jakościowe**

Wyniki badania są ważne, jeżeli:

— wskaźniki oddychania dwóch grup kontrolnych wynoszą 15 % dla każdej z nich,

— wartość EC_{50} (30 minut i/lub trzy godziny) 3,5-dichlorofenolu mieści się w zakresie 5 do 30 mg/litr.

1.6. **Opis metody badawczej**

1.6.1. *Odczynniki*

1.6.1.1. Roztwory substancji testowej

Roztwory substancji testowej są przygotowywane w chwili rozpoczęcia badań z wykorzystaniem roztworu podstawowego. Stężenie roztworu podstawowego w wysokości 0,5 g/litr jest właściwe w przypadku stosowania niżej zalecanej procedury.

1.6.1.2. Roztwór substancji kontrolnej

Roztwór 3,5-dichlorofenolu można przygotować na przykład przez rozpuszczenie 0,5 g 3,5-dichlorofenolu w 10 ml 1M NaOH, rozcieńczając w około 30 ml wody destylowanej, dodając podczas mieszania 0,5M H_2SO_4 do punktu początkowego opadu – na koniec wymagane jest około 8 ml 0,5M H_2SO_4 - a następnie należy rozcieńczyć mieszaninę wodą destylowaną do jednego litra. Wartość pH powinna wówczas wynosić 7–8.

1.6.1.3. Ścieki syntetyczne

Syntetyczną pożywkę dla mikroflory ścieku aktywowanego otrzymuje się przez rozpuszczenie następujących ilości substancji w jednym litrze wody:

— 16 g pepton,

— 11 g ekstrakt mięsa,

— 3 g mocznik,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgS0_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Uwaga 1: Niniejszy ściek syntetyczny jest 100-krotnym koncentratem w porównaniu z koncentratem opisanym w Raporcie technicznym OECD „Proponowana metoda określania biodegradacji środków powierzchniowo czynnych stosowanych w syntetycznych detergentach" (11 czerwca 1976 r.), z dodatkiem ortofosforanu dipotasu.

Uwaga 2: Jeżeli przygotowany środek nie zostanie niezwłocznie zastosowany, należy go przechowywać bez dostępu światła w temperaturze 0 do 4 °C, przez okres nie dłuższy niż jeden tydzień, w warunkach, które nie spowodują żadnej zmiany w jego składzie. Środek można również wysterylizować przed przechowaniem, lub można dodać pepton i ekstrakt mięsa tuż przed rozpoczęciem badania. Przed użyciem należy go dokładnie zmieszać i dostosować pH.

1.6.2. *Urządzenia*

Urządzenia pomiarowe: dokładny projekt nie jest istotny. Jednakże powinna być przestrzeń u góry naczynia, a sonda powinna być ciasno dopasowana w szyjce kolby pomiarowej.

Wymagany jest zwykły sprzęt laboratoryjny, w szczególności następujące urządzenia:

— urządzenia pomiarowe,

— urządzenie napowietrzające,

— elektroda pH i urządzenia pomiarowe,

— elektroda O_2.

1.6.3. *Przygotowanie inokulum*

Aktywowany szlam pochodzący z oczyszczalni ścieków w przeważającej mierze oczyszczającej ścieki wewnętrzne stosowany jest w badaniu jako mikrobiologiczne inokulum.

Jeżeli konieczne, po powrocie do laboratorium, gruboziarniste cząsteczki można usunąć przez osadzanie przez krótki okres czasu, np. 15 minut, i przelanie górnej warstwy drobniejszej suchej masy w celu jej użycia. Ewentualnie szlam można zmieszać przez okres kilku sekund wykorzystując mikser.

Ponadto w przypadku podejrzenia występowania materiału hamującego, szlam należy umyć bieżącą wodą lub roztworem izotonicznym. Po odwirowaniu należy przelać supernatant (procedurę powtarza się trzy razy).

Niewielką ilość szlamu należy zważyć i osuszyć. Na podstawie wyniku można obliczyć ilość mokrego szlamu, którą ma być zawieszona w wodzie w celu uzyskania aktywowanego szlamu o wartości płynnej zawieszonej suchej masy wynoszącej 2–4 g/litr. Niniejszy poziom daje stężenie między 0,8 a 1,6 g/litr w badanej substancji, jeżeli przestrzegana jest niżej zalecana procedura.

Jeżeli szlamu nie można użyć w dniu jego zebrania, należy dodać 50 ml syntetycznego ścieku do każdego litra aktywowanego szlamu przygotowanego w sposób opisany powyżej; następnie należy go napowietrzać przez całą noc w temperaturze 20 ± 2 °C. Napowietrzanie należy stosować aż do chwili jego użycia w dniu następnym. Przed użyciem należy sprawdzić i dostosować pH, jeżeli jest to konieczne, do wartości pH 6–8. Płynną zawieszoną suchą masę należy ustalić w sposób określony w poprzednim ustępie.

Jeżeli wymagane jest użycie tej samej partii szlamu w kolejnych dniach badania (maksymalnie przez cztery dni), należy dodać kolejne 50 ml syntetycznej pożywki dla mikroflory ścieku aktywowanego na litr szlamu po zakończeniu każdego dnia roboczego.

1.6.4. *Przeprowadzenie badania*

Czas trwania/czas kontaktu:	30 minut i/lub trzy godziny, podczas którego przeprowadzane jest napowietrzanie
Woda:	Woda pitna (odchlorowana w razie konieczności)
Dostarczenie powietrza:	Czyste, bezoleiste powietrze. Strumień powietrza 0,5–1 litr/minuta
Aparatura pomiarowa:	Kolba o płaskim dnie taka jak kolba BOD
Tlenomierz:	Odpowiednia elektroda tlenowa, z rejestratorem
Pożywka:	Ścieki syntetyczne (patrz powyżej)
Substancja testowa:	Substancja testowa jest świeżo przygotowywana przed rozpoczęciem badania.
Substancje odniesienia:	np. 3,5-dichlorofenol (co najmniej trzy stężenia)
Kontrole:	Zaszczepiona próbka bez substancji testowej
Temperatura:	20 ± 2 °C.

Poniżej podano sugerowaną procedurę doświadczalną, którą można zastosować zarówno w badaniu oraz do substancji odniesienia w trzygodzinnym czasie kontaktu.

Należy użyć kilka zbiorników (np. jednolitrowe zlewki).

Należy użyć co najmniej pięć wielkości stężeń, rozmieszczonych o stały czynnik najlepiej nie przekraczający 3,2.

W czasie „0”, 16 ml syntetycznej pożywki dla mikroflory ścieku aktywowanego uzupełniane jest wodą do objętości 300 ml. Należy dodać 200 ml inokulum bakteryjnego, a całą mieszaninę (500 ml) wlać do pierwszego zbiornika (pierwsza grupa kontrolna C_1).

Zbiorniki testowe należy stale napowietrzać w celu zapewnienia, że rozpuszczony O_2 nie opadnie poniżej wartości 2,5 mg/litr i że bezpośrednio przed pomiarem wskaźnika oddychania, stężenie O_2 wyniesie około 6,5 mg/litr.

Po „15 minutach" (15 minut stanowi bezwzględny, ale wygodny przedział czasowy) powyższa procedura jest powtarzana, z wyjątkiem 100 ml podstawowego roztworu substancji testowej, które dodaje się do16 ml syntetycznego ścieku przed dodaniem wody do 300 ml i inokulum bakteryjnego w celu uzyskania objętości 500 ml. Następnie mieszanina ta jest wlewana do drugiego zbiornika i napowietrzana w sposób opisany powyżej. Proces powtarzany jest w piętnastominutowych przedziałach czasu z różnymi wielkościami podstawowego roztworu substancji testowej celem uzyskania serii zbiorników zawierających różne stężenia substancji testowej. Na końcu przygotowuje się drugą grupę kontrolną (C_2).

Po upływie trzech godzin odnotowuje się pH, oraz wlewa się dobrze zmieszaną próbkę pobraną z zawartości pierwszego zbiornika do urządzeń pomiarowych i dokonuje się pomiaru wskaźnika oddychania przez czas do 10 minut.

Oznaczenie to powtarza się w odniesieniu do każdego zbiornika w piętnastominutowych odstępach w taki sposób, aby czas kontaktu w każdym zbiorniku wynosił trzy godziny.

Substancja odniesienia badana jest dla każdej partii inokulum bakteryjnego według tej samej procedury.

W przypadku dokonywania pomiarów po 30 minutach kontaktu wymagany jest odmienny reżym (np. więcej niż jeden tlenomierz).

Jeżeli konieczny jest pomiar chemicznego zużycia tlenu, należy przygotować kolejne zbiorniki zawierające substancję testową, syntetyczną pożywkę dla mikroflory ścieku aktywowanego oraz wodę, ale bez aktywnego szlamu. Należy zmierzyć i odnotować zużycie tlenu po trzydziestominutowym okresie napowietrzania i/lub trzech godzinach (czas kontaktu).

2. DANE I OSZACOWANIE

Wskaźnik oddychania obliczany jest na podstawie historii zapisów między około 6,5 mg O_2/litr a 2,5 mg O_2/litr lub przez okres 10 minut, gdzie wskaźnik oddychania jest niski. Odcinek krzywej oddychania, powyżej którego następuje pomiar wskaźnika oddychania powinien być linearny.

Jeżeli wskaźniki oddychania z dwóch grup kontrolnych nie zawierają się w 15 % wartości każdego z nich, lub wartość EC_{50} (30 minut i/lub trzy godziny) substancji odniesienia nie zawiera się w przyjętym przedziale (5 do 30 mg/litr dla 3,5-dichlorofenolu), badanie jest nieważne i musi zostać powtórzone.

Procent zahamowania obliczany jest dla każdej badanej wielkości stężenia (patrz 1.2). Procent zahamowania nanoszony jest na wykres względem stężenia na papierze logarytmicznym (lub papierze półlogarytmicznym), i uzyskanej wartości EC_{50}.

95 % limit potwierdzenia dla wartości EC_{50} może zostać ustalony przez procedury standardowe.

3. SPRAWOZDANIE

3.1. Sprawozdanie z badań

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— dane identyfikacyjne chemicznej substancji testowej,

— system badania: źródło, stężenie i wstępne poddanie aktywnego szlamu działaniu substancji testowej,

— warunki badania:

  — pH mieszaniny reakcji przed pomiarem oddychania,

  — temperatura badania

  — czas trwania badania,

  — substancje odniesienia i pomiar ich EC_{50}

  — pobór abiotycznego tlenu (jeżeli dotyczy).

— wyniki:

  — jakiekolwiek dane pomiarowe,

  — krzywa zahamowania i metoda obliczania EC_{50},

  — EC_{50} i, jeżeli to możliwe, 95 % limitów pewności, EC_{20} i EC_{30}

  — jakiekolwiek uwagi i odstępstwa od metody badawczej, które mogły wpłynąć na wyniki.

3.2. Interpretacja danych

Wartość EC_{50} należy interpretować jedynie jako wskazówkę do prawdopodobnej toksyczności substancji testowej zarówno dla działania na ścieki aktywowanym szlamem, jak i dla mikroorganizmów występujących w ściekach, ponieważ złożone wzajemne oddziaływania zachodzące w środowisku nie mogą być odpowiednio stymulowane podczas badania laboratoryjnego. Ponadto, substancje testowe, które mogą hamująco wpływać na utlenianie amoniaku mogą również powodować nietypowe krzywe zahamowania. W związku z tym, takie krzywe należy interpretować z ostrożnością.

4. **ODNIESIENIA**

(1) Międzynarodowy standard ISO 8192–1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Badania wody* 11, 1977, str. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H.R., Schaefer, L., *Chemosfera* 10, 1981, str. 245.

(4) ETAD (Ekologiczne i Toksykologiczne Stowarzyszenie Przemysłu Przetwórczego Substancji Barwiących), *Zalecana Metoda nr* 103, również opisana przez:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, str. 80.

(6) Schefer, W., Textilveredlung 6, 1977, str. 247.

(7) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania 209,* decyzja Rady C (81) 30 ostateczna.

BIODEGRADACJA

ZMODYFIKOWANE BADANIE SCAS

1. **METODA**

1.1. **Wstęp**

Celem metody jest ocena wpływu całkowitej biodegradacji rozpuszczalnych w wodzie, nielotnych substancji organicznych, w przypadku ich ekspozycji na stosunkowo wysokie stężenia drobnoustrojów przez długi okres czasu. Żywotność drobnoustrojów utrzymywana jest przez ten okres, codziennie dodając zasiedloną pożywkę szlamową. (Odnośnie wymogów związanych z przerwa weekendową, ścieki można przechowywać w temperaturze 4 °C. W związku z tym, można użyć syntetycznych ścieków (test potwierdzający OECD)

Może mieć miejsce fizyczna i chemiczna adsorpcja zawieszonych substancji stałych, co należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników (patrz ppkt 3.2).

Z powodu długiego okresu zatrzymania fazy płynnej (36 godzin), i nieregularnego dodawania odżywek, badanie nie pozoruje faktycznych warunków występujących w oczyszczalni ścieków. Wyniki otrzymane z różnymi substancjami testowymi oznaczają, iż badanie wykazuje wysoki wpływ biodegradacyjny.

Warunki stworzone w badaniu wysoce sprzyjają wyborowi i/lub przystosowaniu drobnoustrojów zdolnych do degradacji badanego związku. (Procedurę można również wykorzystać w celu wytworzenia zaaklimatyzowanego inokulum mogącego być zastosowanym w innych badaniach).

W metodzie tej, pomiar stężenia rozwiązanego węgla organicznego lub chemicznego zapotrzebowania tlenu wykorzystywany jest w celu określenia całkowitej biodegradacji substancji testowej. Najlepiej ustalać DOC po zakwaszeniu i oczyszczeniu niż jako różnicę $C_{całkowite} - C_{nieorganiczne}$.

Równoczesne zastosowanie szczególnej metody analitycznej może umożliwić ocenę podstawowej biodegradacji substancji (zanik pierwotnej budowy chemicznej).

Metodę stosuje się jedynie w odniesieniu do tych organicznych substancji testowych, które przy wielkości stężenia użytego w badaniu:

— są rozpuszczalne w wodzie (przy co najmniej 20 ml rozpuszczonego węgla organicznego/litr),

— posiadają nieznaczne ciśnienie pary,

— nie hamują bakterii,

— nie są znacznie absorbowane w badanym systemie,

— nie są tracone w wyniku wytwarzania piany z badanego roztworu,

Należy ustalić zawartość węgla w organicznym materiale testowym.

Informacje dotyczące względnych części składowych materiału testowego będą użyteczne przy interpretacji otrzymanych wyników, w szczególności w tych przypadkach gdzie wyniki są na niskim poziomie lub marginalne.

Informacje dotyczące wpływu toksyczności substancji na drobnoustroje mogą okazać się użyteczne w celu dokonania interpretacji słabych wyników oraz wyboru właściwych wielkości stężeń.

1.2. **Definicje i jednostki**

C_T = stężenie testowego związku jako węgla organicznego obecnego w lub dodawanego do osadzonego ścieku na początku czasu napowietrzania (mg/litr),

C_t = stężenie rozwiązanego węgla organicznego w supernatanie substancji testowej na końcu czasu napowietrzania (mg/litr),

C_c = stężenie rozwiązanego węgla organicznego w supernatanie w grupie kontrolnej na końcu czasu napowietrzania (mg/litr),

W metodzie tej biodegradacja określana jest jako zanik węgla organicznego. Biodegradację można wyrazić jako:

1. Procent ubytku D_{da} ilości substancji dodawanej codziennie:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1].$$

gdzie: D_{da} = degradacja/dzienna dawka dodana

2. Procent ubytku D_{ssd} ilości substancji obecnej przy rozpoczęciu każdego dnia badania:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\,(i+1)} + 3C_{c\,(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2\ a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2b)]$$

gdzie: D_{ssd} = degradacja/substancji przy rozpoczęciu każdego dnia

wskaźniki i oraz (i + 1) odnoszą się do dnia pomiaru.

Zaleca się równanie 2 a) w przypadku gdy ciecz wypływająca ze zbiornika DOC różni się z dnia na dzień, podczas gdy równanie 2 b) można zastosować, w przypadku gdy ciecz wypływająca ze zbiornika DOC pozostaje na względnie stałym poziomie w kolejnych dniach.

1.3. **Substancje odniesienia**

W niektórych przypadkach, podczas badania nowych substancji, użyteczne mogą okazać się substancje odniesienia; jednakże nie można zalecić żadnych poszczególnych substancji odniesienia.

Dane dotyczące kilku związków chemicznych przeanalizowanych za pomocą prób pierścieniowych dostarczane są głównie w celu przeprowadzenia (patrz dodatek 1) kalibracji metody odpowiednio do potrzeb, i umożliwienia dokonania porównania wyników w przypadku zastosowania innej metody.

1.4. **Zasada metody badawczej**

Aktywowany szlam pochodzący z oczyszczalni ścieków umieszczany jest w jednostce działającej na zasadzie szlamu aktywowanego o przepływie półstałym (SCAS). Następnie dodawany jest badany związek oraz wewnętrzne ścieki po czym następuje napowietrzanie mieszaniny przez 23 godziny. Po 23 godzinach napowietrzanie zostaje przerwane w celu umożliwienia osadzenia się szlamu i ubytku supernatantów.

Następnie szlam pozostały w komorze napowietrzania jest mieszany z dalszą podwielokrotnością badanego związku i ścieku, a cykl jest powtarzany.

Biodegradacja ustalana jest przez określenie zawartości rozwiązanego węgla organicznego w supernatancie. Uzyskana wartość porównywana jest z wartością ustaloną dla płynu otrzymanego z probówki kontrolnej dozowanej jedynie osiadłym ściekiem.

W przypadku użycia szczególnej metody analitycznej można dokonać pomiaru zmian w stężeniu pierwotnej molekuły w wyniku biodegradacji (podstawowa biodegradacja).

1.5. **Kryteria jakościowe**

Reprodukcyjność metody, oparta na ubytku rozwiązanego węgla organicznego, nie została jeszcze ustalona. (W przypadku rozważania podstawowej biodegadacji, bardzo dokładne dane uzyskiwane są w odniesieniu do materiałów degradowanych ekstensywnie).

Czułość metody jest przeważnie ustalana przez zmienność próbki ślepej i, w mniejszym stopniu, przez precyzję określenia rozwiązanego węgla organicznego i poziomu badanego związku w roztworze po rozpoczęciu każdego cyklu.

1.6. **Opis procedury badawczej**

1.6.1. *Przygotowania*

Dla każdej substancji testowej oraz grup kontrolnych składana jest odpowiednia liczba czystych napowietrzanych jednostek, ewentualnie, można zastosować oryginalne, 1,5 litrowe jednostki badawcze SCAS, oraz probówki doprowadzające powietrze (rysunek 1). Sprężone powietrze doprowadzane do jednostek testowych, oczyszczone przez bawełniano-wełniany filtr, nie powinno zawierać węgla organicznego oraz powinno zostać nasycone wodą w celu obniżenia jej ubytku wskutek parowania.

Próbka zmieszanego płynu, zawierająca 1–4 g zawieszonej suchej masy na litr, otrzymywana jest z oczyszczalni ścieków, oczyszczającej w głównej mierze ścieki wewnętrzne. Wymagane jest około 150 ml zmieszanego płynu dla każdej napowietrzanej jednostki.

Roztwory podstawowe substancji testowej przygotowywane są w wodzie destylowanej; wymagana wartość stężenia zazwyczaj wynosi 400 mg/litr, tak jak węgiel organiczny, którego stężenie substancji testowej wynosi 20 mg/litr węgla na początku każdego cyklu napowietrzania, jeżeli nie zachodzi biodegradacja.

Dopuszczane są wyższe stężenia, jeżeli pozwala na to wpływ toksyczności na drobnoustroje.

Skład węgla organicznego roztworów podstawowych podlega pomiarowi.

1.6.2. *Warunki badania*

Badanie należy przeprowadzić w temperaturze 20–25 °C.

Stosowane jest wysokie stężenie drobnoustrojów tlenowych (od 1 do 4 g/litr zawieszonej suchej masy), a skuteczny okres zatrzymania wynosi 36 godzin. Materiał zawierający węgiel w pożywce szlamowej jest rozlegle utleniany, zazwyczaj w ciągu ośmiu godzin od rozpoczęcia każdego cyklu napowietrzania. Od tego czasu szlam oddycha endogenicznie przez pozostały czas napowietrzania, w którym jedyny dostępny substrat stanowi związek testowy, jeżeli również nie ulega łatwej metabolizacji. Cechy te, połączone z codziennym szczepieniem substancją testową, w przypadku zastosowania wewnętrznego ścieku jako pożywki, zapewniają wysoce korzystne warunki zarówno dla aklimatyzacji, jak i dla wysokiego stopnia biodegradacji.

1.6.3. *Przeprowadzenie badania*

Próbka zmieszanego płynu pochodząca z oczyszczalni ścieków, oczyszczającej w głównej mierze ścieki wewnętrzne lub jednostki laboratoryjnej, uzyskiwana jest i utrzymywana w warunkach tlenowych aż do chwili jej użycia w laboratorium. Każda napowietrzana jednostka, a także jednostka kontrolna wypełniana jest 150 ml zmieszanego płynu (w przypadku użycia oryginalnej jednostki testowej SCAS, należy pomnożyć dane wielkości przez 10) i rozpoczyna się napowietrzanie. Po 23 godzinach, napowietrzanie zostaje przerwane na 45 minut, w celu umożliwienia osadzenia się szlamu. Z kolei należy otworzyć zawór każdego zbiornika i pobrać 100 ml porcję supernatanu. Próbka osiadłego ścieku wewnętrznego powinna zostać pobrana bezpośrednio przed jej użyciem, i 100 ml dodawane jest do szlamu pozostającego w każdej napowietrzanej jednostce. Proces napowietrzania rozpoczyna się od nowa. W tej fazie nie są dodawane żadne materiały testowe, a jednostki zasilane są codziennie wyłącznie wewnętrznymi ściekami aż do chwili otrzymania czystego supernatanu po osadzeniu. Powyższa faza zazwyczaj trwa dwa tygodnie, podczas których rozwiązany węgiel organiczny w supernatanie zbliża się do stałej wartości na końcu każdego cyklu napowietrzania.

Po upływie tego okresu poszczególne osadzone szlamy należy zmieszać i dodać 50 ml otrzymanego w ten sposób połączonego szlamu do każdej jednostki.

95 ml osadzonego ścieku i 5 ml wody dodawane jest do jednostek kontrolnych, i 95 ml osadzonego ścieku plus 5 ml właściwego roztworu podstawowego badanego związku (400 mg/litr) dodawane jest do jednostek testowych. Napowietrzanie należy rozpocząć od nowa i kontynuować przez 23 godziny. Następnie należy umożliwić osadzenie się szlamu przez okres 45 minut oraz należy ściągnąć i przeanalizować supernatan w celu ustalenia składu rozwiązanego węgla organicznego.

Powyższą procedurę napełniania i ściągania powtarza się codziennie przez cały okres trwania badania.

Przed osadzeniem konieczne jest oczyszczenie ścian jednostek w celu zapobieżenia nagromadzania się suchej masy ponad poziom płynu. W tym celu należy użyć oddzielnego skrobaka lub szczotki dla każdej z jednostek, aby zapobiec zanieczyszczeniu krzyżowemu.

Najlepiej, aby wartość rozwiązanego węgla organicznego w supernatanie ustalana była codziennie, chociaż dopuszcza się rzadsze przeprowadzanie analiz. Przed przeprowadzeniem analiz, płyny filtrowane są przez oczyszczone 0,45 μm filtry membranowe lub odwirowywane. Filtry membranowe są odpowiednie jeżeli zostanie potwierdzone, iż nie uwalniają węgla ani nie absorbują substancji w fazie filtracji. Temperatura próbki nie może przekraczać 40 °C w chwili umieszczenia jej w wirówce laboratoryjnej.

Długość trwania badania w odniesieniu do związków wykazujących niską lub zerową biodegradację nie jest określona, ale doświadczenie sugeruje, iż taki okres powinien trwać co najmniej 12 tygodni, ale nie dłużej niż 26 tygodni.

2. DANE I OSZACOWANIE

Wartości rozwiązanego węgla organicznego w supernatanach w jednostkach testowych i jednostkach kontrolnych nanoszone są na wykres względem czasu.

W przypadku osiągnięcia biodegradacji jej poziom określony w jednostce badawczej zbliży się do poziomu w jednostce kontrolnej. Po ustaleniu stałej różnicy między dwoma poziomami w trzech kolejnych pomiarach, liczba kolejnych pomiarów uzależniona jest od możliwości dokonania statystycznej analizy danych oraz należy obliczyć procentową biodegradację związku testowego(D_{da} lub D_{ssd}, patrz 1.2).

3. **SPRAWOZDANIE**

3.1. **Sprawozdanie z badań**

Sprawozdanie z badań powinno, jeżeli możliwe, zawierać następujące informacje:

— wszelkie informacje dotyczące rodzaju ścieku, typu zastosowanej jednostki oraz wyniki badania dotyczące substancji testowej, substancji odniesienia, jeżeli została użyta, oraz próbki ślepej,

— temperatura,

— krzywa ubytku związku wraz z opisem, sposób obliczania (patrz 1.2),

— data i lokalizacja pobrania próbki aktywowanego szlamu i ścieku, poziom przystosowania, stężenie itd.,

— naukowe powody jakichkolwiek zmian procedury badawczej,

— data i podpis.

3.2. **Interpretacja wyników**

Ponieważ substancja przeznaczona do badania niniejszą metodą nie będzie ulegać łatwej biodegradacji, jakikolwiek ubytek DOC spowodowany wyłącznie biodegradacją przebiegać będzie stopniowo w okresie dni i tygodni, z wyjątkiem takich przypadków, gdzie aklimatyzacja jest nagła i zasygnalizowana nagłym zniknięciem substancji następującym po okresie kilku tygodni.

Jednakże fizyko-chemiczna adsorpcja może w niektórych przypadkach odegrać istotną rolę; sygnalizowane jest to w chwili gdy następuje całkowity lub częściowy ubytek dodanego DOC na początku badania. To, co następuje później zależy od czynników, takich jak stopnie adsorpcji i stężenia zawieszonej suchej masy w odrzuconej cieczy wypływającej ze zbiornika. Zwykle różnica między stężeniami DOC w supernatanach w grupie kontrolnej i w grupie badanej stopniowo wzrasta od początkowej niskiej wartości, a następnie utrzymuje się na nowym poziomie wartości w pozostałym okresie badania, jeżeli nie zachodzi aklimatyzacja.

Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, jeżeli istnieje potrzeba rozróżnienia między biodegradacją (lub częściową biodegradacją) i adsorpcją. Można to osiągnąć na wiele sposobów, ale najbardziej przekonujące jest użycie supernatantu lub szlamu jako inokulum w teście podstawowym (najlepiej teście respirometrycznym)

Substancje testowe powodujące wysoki, nieadsorpcyjny ubytek DOC w niniejszym badaniu należy uważać za substancje wpływające biodegradacyjnie. Częściowy, nieadsorpcyjny ubytek oznacza, że substancja chemiczna ulega co najmniej nieznacznej biodegradacji.

Niski lub zerowy poziom ubytku DOC może być spowodowany zahamowaniem aktywności drobnoustrojów przez substancję testową, co można również wykryć przez rozpad lub utratę szlamu, dającego mętne supernatany. Badanie należy powtórzyć, wykorzystując niskie stężenie substancji testowej.

Użycie specyficznej dla danego związku metody analitycznej lub substancji testowej znakowanej izotopem węgla ^{14}C zwiększa czułość metody. W przypadku związków znakowanych ^{14}C, odzyskanie $^{14}CO_2$ potwierdzi, że zaszła biodegradacja.

W przypadku podawania wyników z uwzględnieniem początkowej biodegradacji, jeżeli możliwe, należy wyjaśnić zmianę w budowie chemicznej, która powoduje utratę reakcji macierzystej substancji testowej.

Zatwierdzenie metody analitycznej musi być dostarczone razem z reakcją, która zaszła w próbce ślepej.

4. **ODNIESIENIA**

(1) OECD, Paryż, 1981, *Wytyczne Badania 209,* decyzja Rady C (81) 30 ostateczna.

Dodatek 1

Badanie SCAS: przykładowe wyniki

Substancja	C_T (mg/l)	$C_I - C_C$ (mg/l)	Procentowa biodegradacja, D_{da}	Czas trwania badania (dni)
Sulfonian 4-acetyloaminobenzenu	17,2	2,0	85	40
Sulfonian tetrapropylenobenzenu	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Glikol dietylenowy	16,5	0,2	98,8	40
Anilina	16,9	1,7	95,9	40
Cyklopentanotetrakarboksylan	17,9	3,2	81,1	120

Dodatek 2

Przykładowe urządzenia badawcze

Rysunek 1

