31988L0302

30.5.1988 URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI L 133/1

DIREKTIVA KOMISIJE

z dne 18. novembra 1987

o deveti prilagoditvi tehničnemu napredku Direktive Sveta 67/548/EGS o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi

(88/302/EGS)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske gospodarske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 67/548/EGS z dne 27. junija 1967 o približevanju zakonov in drugih predpisov v zvezi z razvrščanjem, pakiranjem in označevanjem nevarnih snovi [1], kakor je bila šestič spremenjena z Direktivo 79/831/EGS [2], in zlasti člena 19 Direktive,

ker člen 3(1) Direktive 67/548/EGS predvideva, da se fizikalno-kemijske lastnosti, strupenost in strupenost za okolje snovi in pripravkov določijo v skladu z metodami, opisanimi v Prilogi V;

ker člen 3(2) Direktive 67/548/EGS predvideva, da se prava ali možna nevarnost snovi ali pripravka, ki jo lahko predstavlja za okolje, oceni v skladu z značilnostmi, določenimi v prilogah VII in VIII;

ker Priloga V k različici, predstavljeni z Direktivo Komisije 84/449/EGS [3], trenutno vsebuje le tiste preskusne metode, ki so v skladu z značilnostmi, podrobno navedenimi v Prilogi VII, in ker je treba tudi dati na razpolago preskusne metode, ki so v skladu z značilnostmi, podrobno navedenimi v Prilogi VIII;

ker so določbe iz te direktive v skladu z mnenjem Odbora za prilagajanje tehničnemu napredku direktiv o odpravi tehničnih ovir pri trgovanju z nevarnimi snovmi in pripravki,

SPREJELA NASLEDNJO DIREKTIVO:

Člen 1

Besedilo Priloge k tej direktivi se doda Prilogi V k Direktivi 67/548/EGS.

Člen 2

Države članice sprejmejo in objavijo določbe, potrebne za uskladitev s to direktivo, pred 31. decembrom 1988, in o tem takoj obvestijo Komisijo. Te določbe se začnejo uporabljati najpozneje 30. junija 1989.

Člen 3

Ta direktiva je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 18. novembra 1987

Za Komisijo

Stanley CLINTON DAVIS

Član Komisije

---

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

PRILOGA

Tukaj opisane preskusne metode so namenjene določitvi nekaterih toksikoloških in ekotoksikoloških lastnosti, naštetih v Prilogi VIII k Direktivi Sveta 79/831/EGS. Opisane so preskusne metode, ki ustrezajo stopnji 1 in stopnji 2 Priloge VIII, vendar ti preskusi niso porazdeljeni na podlagi različnih stopenj.

KAZALO

	Stran
DEL B: Metode za določanje strupenosti	4
Splošni uvod: Del B	4
Preskus subkronične oralne strupenosti: 90-dnevni preskus s ponovljenim oralnim odmerkom na glodalcih	8
Preskus subkronične oralne strupenosti: 90-dnevni preskus s ponovljenim oralnim odmerkom na neglodalcih	12
Študija subkronične strupenosti v stiku s kožo: 90-dnevna študija s ponovljenim dermalnim odmerkom na glodalcih	16
Študija subkronične inhalatorne strupenosti: 90-dnevna študija s ponovljenim inhalacijskim odmerkom na glodalcih	20
Preskus teratogenosti – glodalci in neglodalci	24
Preskus kronične strupenosti	27
Preskus rakotvornosti	32
Kombiniran preskus kronične strupenosti/rakotvornosti	37
Preskus strupenosti za razmnoževanje na eni generaciji	43
Preskus strupenosti za razmnoževanje na dveh generacijah	47
Toksikokinetika	51
Preskus mutagenosti in presejalna študija rakotvornosti	55
— Genska mutacija – *Saccharomyces cerevisiae*	55
— Mitotična rekombinacija – *Saccharomyces cerevisiae*	58
— Preskus genske mutacije na sesalskih celicah *in vitro*	61
— Okvare in popravljanje DNK – nenačrtna sinteza DNK – sesalske celice *in vitro*	64
— Preskus izmenjave sestrskih kromatid *in vitro*	68
— Preskus spolno vezane recesivne smrtnosti na *Drosophila melanogaster*	71
— Preskus celične transformacije sesalskih celic *in vitro*	73
— Preskus dominantne smrtnosti na glodalcih	76
— Citogenetski preskus na zarodnih sesalskih celicah *in vivo*	79
— Preskus pojava madežev na miših	82
— Preskus dedne translokacije na miših	85
DEL C: Metode za določanje strupenosti za okolje	88
Splošni uvod: Del C	88
Preskus zaviranja rasti alg	89
Strupenost za deževnike: Preskus z umetnimi tlemi	95
Biorazgradnja: Zahn – Wellensov preskus	99
Biorazgradnja: Simulacijski preskusi v aktivnem blatu	106
Biorazgradnja: Preskus zaviranja dihanja aktivnega blata	118
Biorazgradnja: Spremenjeni SCAS preskus	123

DEL B: METODE ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI

SPLOŠNI UVOD: DEL B

DOLGODOBNE ŠTUDIJE

Subkronične študije, kronične študije,študije rakotvornosti

Določitev preskusne snovi in obdelovalne zmesi

Sestava preskusne snovi, vključno z glavnimi nečistotami, in ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, vključno z stabilnostjo, morajo biti znane pred začetkom vsake študije strupenosti.

Fizikalno-kemijske lastnosti preskusne snovi dajejo pomembne podatke za izbor načina dajanja, zasnovo subkroničnih, kroničnih študij ali študij rakotvornosti ter ravnanje s preskusnimi snovmi in njihovo shranjevanje.

Podatki o kemijski sestavi in fizikalno-kemijskih lastnostih lahko kažejo tudi na absorpcijske značilnosti glede na predviden način dajanja snovi ter o metabolnih možnostih in možnostih razporeditve v tkivih. Lahko obstajajo tudi podatki o toksikokinetičnih parametrih iz predhodnih študij strupenosti in toksikokinetike.

Analitsko metodo za kvalitativno in kvantitativno določanje preskusne snovi (vključno z glavnimi nečistotami, kadar je to mogoče) v odmerjenem mediju in biološkem materialu je treba razviti pred začetkom študije.

Preskusne živali: izbira vrst in sevov

Ker je treba živali tretirati večino njihove življenjske dobe, se študije omejujejo na preskusne vrste, ki jih ni težko vzdrževati in ki imajo kratko življensko dobo. Zelo zaželeno je poznati pojavnost spontanih bolezni in tumorjev na sevu uporabljene živali, v podobnih pogojih vzdrževanja.

Sevi morajo biti dobro poznani in brez prirojenih okvar, ki bi vplivale na preskus. Uporaba sevov, pridobljenih s parjenjem sorodnikov ali križancev prve generacije F1, ima v tem smislu nekaj prednosti, toda kadar je na voljo dovolj osnovnih podatkov o sevih, križanih nesorodnih sevov, z živalmi ki izhajajo iz zaprtih kolonij, so ti prav tako sprejemljivi.

Oskrba živali, hrana in oskrba z vodo

Preskusi in študije na živalih se izvajajo v skladu z nacionalnimi predpisi pri tem pa je potrebno upoštevati humana načela ter mednarodni razvoj na področju zaščite živali.

Za pridobitev pomenljivih rezultatov so obvezni strog nadzor stanja bivalnega okolja in ustrezne tehnike oskrbe živali. Dejavniki, kot so pogoji bivanja, istočasne bolezni, terapija z zdravili, nečistote v hrani, zraku, vodi in stelji ter splošne zmogljivosti oskrbe živali lahko bistveno vplivajo na izid študij s ponovljenim odmerkom. Na splošno mora biti poznan učinek kemijskih sterilizacijskih snovi na študijo.

Hrana mora izpolnjevati vse hranilne potrebe preskusne vrste in ne sme vsebovati nečistot, ki bi lahko vplivale na izid preskusa. Glodalce je treba hraniti in napajati *ad libitum*, hrana pa je treba menjati najmanj enkrat tedensko. Trenutno se uporabljajo trije tipi hrane: konvencionalna hrana, sintetična hrana in različne vrste hrane z znano kvantitativno sestavo.

Dobavitelji morajo za vsako izbrano hrano na podlagi rednega spremljanja preverjati hranilno vrednost in stopnjo kontaminantov v osnovni hrani ter posredovati podatke laboratoriju za vsako serijo hrane. Zelo zaželeno je poznavanje učinkov prehrambnega režima na metabolizem, kakor tudi na razvoj tumorjev in življensko dobo živali.

Poleg tega lahko preskuševalni laboratorij opravi kontrolne analize osnovne hrane za sestavine hrane in nenamerne kontaminante, vključno z rakotvornimi snovmi. Če se to opravi, je treba rezultate analiz shraniti in vključiti v zaključno poročilo o vsaki preskusni snovi.

Običajne prehrambne sestavine, za katere je poznano, da vplivajo na rakotvornost (npr. antioksidanti, nenasičene maščobne kisline, selen), ne smejo biti prisotne v motečih koncentracijah. Zaradi potencialnega vpliva mnogih običajnih kontaminantov v hrani na oceno rakotvornosti je treba posebno pozornost usmeriti na prisotnost ostankov pesticidov, organoklorovih spojin, policikličnih aromatičnih ogljikovodikov, estrogena, težkih kovin, nitrosaminov in mikotoksinov v hrani.

Kadar se preskusna snov daje z vodo ali hrano, so bistveni preskusi stabilnosti. Preskuse stabilnosti in homogenosti ustrezno opravljene še pred študijami pri ponovljenih odmerkih, se uporabi za določitev pogostosti priprave hrane in zahtevanega spremljanja.

Med sterilizacijo hrane morajo biti poznani učinki takšnih postopkov na preskusno snov in prehrambne sestavine. Izvesti je treba vse ustrezne prilagoditve.

Med preskusi rakotvornosti se morajo raziskovalci zavedati možnih kontaminantov v uporabljeni vodi. Voda, dovoljena za človeško porabo, je sicer zadovoljiva, na razpolago pa morajo biti podatki o njeni sestavi.

Koncentracijo preskusne snovi v hrani bo verjetno treba prilagoditi rasti živali, da bi se vzdrževal ustrezen konstanten vnos preskusne snovi glede na telesno maso.

Hranilna vrednost kontrolne in preskusne hrane mora biti kolikor je mogoče podobna. Zaradi tega je treba upoštevati hranilno vrednost preskusne snovi, vmešane v hrano. Izkušnje kažejo, da do 5 % nehranilnih preskusnih snovi v hrani verjetno ne bo pomembno vplivalo na hranilno vrednost hrane.

1. **Inhalacijske študije**

Ker se je pokazalo, da ni mogoče določiti ene same mejne inhalacijske vrednosti, ni opredeljen nikakršen mejni preskus.

2. **Študija teratogenosti**

Preskusna metoda je predvsem usmerjena k načinu dajanja po oralni poti. Mogoče je uporabiti tudi druge načine, odvisno od fizikalnih lastnosti preskusne snovi ali možnega načina izpostavljenosti človeka. V takšnih primerih je treba preskusno metodo ustrezno prilagoditi, upoštevajoč ustrezne elemente 28 dnevnih preskusnih metod.

3. **Toksikokinetika**

Študije toksikokinetike pomagajo pri razlagi in oceni podatkov o strupenosti. Te študije so namenjene pojasnjevanju nekaterih vidikov strupenosti preskušane kemikalije, rezultati pa so lahko v pomoč pri planiranju nadaljnjih študij strupenosti. Potreba po določanju vseh parametrov v vsakem posameznem primeru ni predvidena. Le v redkih primerih bo potreben celotno zaporedje študij toksikokinetike (absorpcija, izločanje, porazdelitev in metabolizem). Za nekatere sestavine so lahko priporočljive spremembe v tem zaporedju ali pa zadostuje že študija pri enem samem odmerku.

Opredelitev pojmov

Toksikokinetika:	študija o absorpciji, porazdelitvi, metabolizmu in izločanju preskusnih snovi;
Absorpcija:	proces(i), s katerim(i) dana snov vstopi v telo;
Izločanje:	proces(i), s katerem(i) se dana snov in/ali njeni metaboliti odstranijo iz telesa;
Porazdelitev:	proces(i), s katerem(i) se absorbirana snov in/ali njeni metaboliti porazdelijo v telesu;
Metabolizem:	proces(i), s katerem(i) se dane snovi strukturalno spremenijo v telesu, bodisi z encimskimi ali neencimskimi reakcijami.

4. **Akutna in subakutna študija na drugi vrsti**

Namen študije na drugi vrsti je dopolniti zaključke, izpeljane iz prve študije.

V primeru študije na drugi vrsti se lahko uporabi že opisana preskusna metoda ali pa se jo prilagodi za manjše število živali.

5. **Študije plodnosti**

Kadar je zahtevan preskus razmnoževanja na treh generacijah, je mogoče opisano metodo za preskus razmnoževanja na dveh generacijah razširiti tako, da zajame še tretjo generacijo.

6. **Študije mutagenosti**

Dodatni preskusi mutagenosti, vključno s presejalnimi preskusi za rakotvornost

V Prilogi VIII k Direktivi so navedene dodatne študije za nadaljnjo raziskavo mutagenosti ali predhodni presejalni preskus rakotvornosti. Študije, opisane v tem oddelku, je na splošno mogoče uporabiti za raziskavo obeh vidikov.

Uvod

Uvodna ocena mutagene aktivnosti snovi sestoji iz preskusov genskih (točkastih) mutacij pri bakterijah in citogenetskih okvar na sesalskih celicah (*in vitro* ali *in vivo*); ustrezne metode teh študij iz „osnovne zbirke preskusov" so bile opisane predhodno. Ta oddelek se ukvarja z dopolnilnimi študijami, primernimi za potrditev in/ali razširitev rezultatov, pridobljenih v osnovni zbirki preskusov in ki jih je mogoče uporabiti v več namenov:

1. za potrditev rezultatov, pridobljenih v osnovni zbirki preskusov;

2. za raziskavo ciljnih učinkov, ki v osnovni zbirki niso bili obravnavani;

3. za začetek ali razširitev *in vivo* študij.

Za te namene niz opisanih preskusov zajema *in vitro* in *in vivo* evkariontske sisteme ter razširjen obseg bioloških ciljnih učinkov. Ti preskusi zagotavljajo podatke o točkastih mutacijah v organizmih, ki so bolj kompleksni od bakterij, uporabljenih v osnovni zbirki, ter dopolnjujejo podatke o sposobnosti snovi, da povzroči kromosomske aberacije.

Opisani so tudi preskusi za druge ciljne učinke, ki ne zajemajo točkastih mutacij in kromosomskih aberacij. Ti dajejo dopolnilne podatke in jih je mogoče, kot je to primerno, uporabiti v preskusnih načrtih.

Splošno načelo je, da v primeru načrtovanja programa za nadaljnje študije mutagenosti, se te študije zasnuje tako, da bodo zagotavljale relevantne dodatne podatke o mutagenem in/ali rakotvornem potencialu te snovi.

Dejanske študije, ki lahko ustrezajo v točno določenem primeru, bodo odvisne od številnih dejavnikov, vključno s kemijskimi in fizikalnimi značilnostmi snovi, rezultati začetnih bakterijskih in citogenetskih preskusov, metaboličnim profilom snovi, rezultati drugih študij strupenosti ter poznanimi uporabami snovi. Strog razpored za izbiro preskusov je zatorej glede na raznovrstnost dejavnikov, ki bi jih bilo treba upoštevati, neustrezen. Kljub temu pa je mogoče slediti nekaterim splošnim načelom. Če je bil preskus v osnovni zbirki pozitiven, morajo dopolnilne študije vključevati najmanj en preskus, s katerim je mogoče odkriti enak genetski ciljni učinek. Če sta bila oba preskusa v osnovni zbirki negativna, je običajno treba kot dopolnilni študiji opraviti preskus genske mutacije in preskus kromosomske aberacije. Prav tako je lahko ustrezno pridobiti dodatne podatke s pomočjo indikatorskih preskusov (kot so navedeni spodaj).

Metode takšnih raziskav so spodaj razvrščene po skupinah na podlagi njihovega osnovnega genetskega ciljnega učinka.

Študije za preiskavo genskih (točkastih) mutacij

Eden izmed naslednjih preskusov je lahko primeren za nadaljnjo raziskavo potenciala snovi, da povzroči genske (točkaste) mutacije:

(a) Študije naprednih ali povratnih mutacij z uporabo evkariontskih mikroorganizmov (*Saccharomyces cerevisiae*).

(b) *In vitro* študije za raziskavo napredne mutacije v sesalskih celicah.

(c) Spolno vezan preskus recesivne smrtnosti na *Drosophila melanogaster*.

(d) *In vivo* preskus mutacije v somatskih celicah: preskus pojava madežev na miših.

Študije za raziskavo kromosomskih aberacij

Eden izmed naslednjih preskusov je lahko primeren za nadaljnjo raziskavo potenciala snovi, da povzroči kromosomske aberacije:

(a) *In vivo* citogenetske študije na sesalcih;

Upoštevati je treba *in vivo* analizo metafaze celic kostnega mozga, če ta ni bila vključena v začetno oceno (osnovna zbirka preskusov). Poleg tega je treba opraviti *in vivo* citogenetsko preiskavo zarodnih celic;

(b) *In vitro* citogenetske študije na sesalskih celicah, če niso bile vključene v začetno oceno;

(c) Študije dominantne smrtnosti na glodalcih;

(d) Preskus dedne translokacije na miših.

Indikatorski preskusi vplivov na DNK

Na voljo so metode, ki dajejo indikacijo nekaterih vplivov na DNK, katerih ciljni učinek pa ni mutagen pojav. Te študije lahko prispevajo podatke, ki dopolnjujejo že pridobljene podatke iz študij mutagenosti, in ki so lahko koristni pri razlagi takšnih študij. Kadar so potrebne takšne študije, je lahko ustrezna ena izmed naslednjih metod z uporabo evkariontskih mikroorganizmov ali sesalskih celic:

(a) Mitotična rekombinacija na *Saccharomyces cerevisiae*;

(b) Poškodbe in popravljanje DNK – nenačrtna sinteza DNK –sesalske celice *(in vitro)*

(c) Preskus izmenjave med sestrskimi kromatidami v sesalskih celicah *(in vitro)*

Drugi indikatorski preskusi rakotvornega potenciala

Na voljo so preskusi transformacije sesalskih celic, ki merijo sposobnost snovi, da povzroči morfološke in vedenjske spremembe v celični kulturi, ki naj bi bile povezane z maligno transformacijo *in vivo*. Uporabiti je mogoče veliko različnih celičnih tipov in kriterijev za transformacijo.

Ocena tveganja za dedne učinke na sesalcih

Na voljo so metode za določanje dednih učinkov na sesalcih, povzročenih z genskimi (točkastimi) mutacijami (preskus specifičnih lokusov na miših ([1])) ali za kromosomske aberacije (preskus dedne translokacije na miših). Takšne metode je mogoče uporabiti pri ocenjevanju možnega genetskega tveganja snovi za človeka. Upoštevajoč kompleksnost teh preskusov in zelo veliko število potrebnih živali, zlasti za preskus specifičnih lokusov pri miših, pa je pred samim začetkom teh študij potrebna trdna utemeljitev.

([1]) Preskus specifičnih lokusov pri miših (ki v tem dokumentu ni opisan) je mogoče uporabiti za določitev mutacije v zarodnih celicah pri prvi generaciji po izpostavitvi mutageni snovi. Opaziti in izmeriti je mogoče genetske spremembe, ki vodijo do sprememb v genskih produktih, ki tvorijo vidne fenotipe.

PRESKUS SUBKRONIČNE ORALNE STRUPENOSTI

90-DNEVNI PRESKUS S PONOVLJENIM ORALNIM ODMERKOM NA GLODALCIH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se daje dnevno, oralno, v graduiranih odmerkih nekaj skupinam preskusnih živali, po en odmerek na skupino v obdobju 90 dni. V obdobju dajanja se živali opazujejo dnevno, da bi se odkrilo znake strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi nekropsija, po zaključku preskusa pa se nekropsija opravi tudi na preživelih živalih.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali razporedijo v preskusne in kontrolne skupine.

Preskusna snov se lahko daje s hrano, z gavažo, v kapsulah ali s pitno vodo. Vsem živalim je treba dajati odmerke z enako metodo tekom celotnega preskusnega obdobja. Če se za lažje dajanje odmerkov uporabi nosilec ali drugi dodatki, se je treba prepričati, da le-ti ne povzročajo strupenih učinkov. Če je ustrezno, se lahko uporabijo pretekli podatki.

Preskusni pogoji

Preskusne živali

Če ni kontraindikacij, je priporočena vrsta podgana. Uporabiti je treba splošno uporabljene laboratorijske seve mladih zdravih živali. Najprimernejši čas za začetek dajanja odmerkov je, preden podgane dopolnijo šest tednov, v nobenem primeru pa ne smejo biti stare več kot osem tednov. Na začetku študije nihanje v teži uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti. Kadar se subkronična oralna študija izvaja kot predhodnica dolgodobni študiji oralne strupenosti, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto in sev.

Število in spol

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 20 živali (10 samic in 10 samcev). Samice naj bodo nuliparne in nebreje. Če so načrtovana vmesna žrtvovanja, je treba število povečati za število živali, ki naj bi bile žrtvovane še pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko z odmerkom visoke velikosti 90 dni tretira satelitsko skupino 20 živali (10 živali na spol) in na njih opazuje povratnost, obstojnost ali zapozneli pojav strupenih učinkov v 28 dneh po tretiranju.

Velikosti odmerka

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerka in kontrolno skupino. Razen tretiranja s preskusno snovjo je treba z živalmi v kontrolni skupini ravnati na popolnoma enak način kot z živalmi iz preskusne skupine. Kadar je za lažje dajanje odmerkov uporabljen nosilec, ga je treba pri kontrolni skupini odmeriti na enak način kot pri preskusnih skupinah, dobiti pa morajo tudi enako količino nosilca, kot jo je dobila skupina z najvišjo velikostjo odmerka. Najvišja velikost odmerka bi morala povzročiti strupene učinke, vendar malo smrtnih primerov ali nobenega. Najnižja velikost odmerka ne sme povzročiti nikakršnih znakov strupenosti. Kadar imamo na voljo uporabno oceno izpostavljenosti človeka, mora najnižja velikost to presegati. V najboljšem primeru bi morala srednja velikost odmerka povzročiti minimalne opazne strupene učinke. Če je uporabljena več kot ena srednja velikost odmerka, je treba te velikosti razporediti tako, da dobimo stopnjevanje strupenih učinkov.

Za pomenljivo oceno rezultatov v skupinah z nizkim in srednjim odmerkom ter v kontrolnih skupinah mora biti pojav smrtnih primerov nizek.

Kadar se preskusna snov daje s hrano, se lahko uporabi ali konstantna koncentracija v hrani (ppm ali mg/kilogram hrane) ali konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali; uporabljeni izbor je treba natančno opredeliti. Kadar se snov daje z gavažo, je treba odmerek dati vsak dan ob približno istem času. Velikosti odmerka je treba prilagajati v časovnih presledkih (tedensko ali dvotedensko), da se ohrani konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali.

Mejni preskus

Če 90-dnevni preskus, opravljen v skladu s spodaj obrazloženo metodo, pri odmerku velikosti 1 000 mg/kilogram telesne mase/dan, ali pri višji velikosti odmerka, povezani z možno izpostavljenostjo človeka, kadar je ta poznana, ne pokaže nikakršnih znakov strupenih učinkov, nadaljnji preskusi verjetno ne bodo potrebni. V primeru snovi z nizko strupenostjo je pomembno zagotoviti, da količine in druge lastnosti uporabljene preskusne snovi, dane s hrano, ne sovpadajo z zahtevami normalne prehrane.

Čas opazovanja

Vse živali je treba dnevno opazovati in beležiti znake strupenosti vključno s časom njihovega pojava, stopnjo in trajanjem. Zabeležiti je treba čas smrti in čas, ko se znaki strupenosti pojavijo in izginejo.

Postopek

Najprimerneje je, da se živalim odmerek preskusne snovi daje sedem dni na teden, v obdobju 90 dni. Živali iz katere koli satelitske skupine, za katero so načrtovana nadaljnja opazovanja, je treba vzdrževati še nadaljnjih 28 dni brez tretiranja, da se odkrije okrevanje ali obstojnost strupenih učinkov.

Opazovanje v kletkah naj vključuje spremembe na koži in krznu, v očeh in sluznici, ter v dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba meriti porabo hrane (in porabo vode, kadar se preskusna snov daje s pitno vodo) in živali vsak teden stehtati.

Redno opazovanje živali je potrebno za zagotovitev, da med preskusom ne pride do izgube živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napačne postavitve. Na koncu preskusnega obdobja se na vseh preživelih živalih iz nesatelitske preskusne skupine opravi nekropsija. Umirajoče živali je treba odstraniti in opraviti nekropsijo takoj, ko je to opaženo.

Naslednji pregledi se običajno opravijo na vseh živalih, vključno s kontrolnimi skupinami:

(a) Oftalmološki pregled z uporabo oftalmoskopa ali podobne ustrezne opreme je treba opraviti pred dajanjem preskusne snovi in ob zaključku študije, po možnosti na vseh živalih, najmanj pa na skupinah z visokim odmerkom in kontrolnih skupinah. Če se odkrijejo spremembe v očeh, je treba pregledati vse živali.

(b) Hematološko preiskavo, vključno s hematokritom, koncentracijo hemoglobina, številom eritrocitov, skupnim in diferencialnim številom levkocitov ter merjenjem zmožnosti koagulacije, kot je čas koagulacije, protrombinski čas, tromboplastinski čas ali število krvnih ploščic, je treba opraviti na koncu preskusnega obdobja.

(c) Klinično biokemijsko določitev na krvi je treba izvesti na koncu preskusnega obdobja. Preskusna področja, ki štejejo za ustrezna vsem študijam, so ravnovesje elektrolitov, presnova ogljikovih hidratov, delovanje jeter in ledvic. Izbor določenih preskusov bo odvisen od opazovanj načina delovanja snovi. Predlagane določitve

so: meritve kalcija, fosforja, klora, natrija, kalija, glukoze na tešče (z obdobjem teščosti, ustreznim za posamezno vrsto), serumske glutaminske piruvične transaminaze [1], serumske glutaminske oksaloacetat transaminaze [2], ornitin-dekarboksilaze, gama-glutamil-transpeptidaze, sečnine, albumina, kreatinina v krvi, skupnega bilirubina in skupnih serumskih proteinov. Druge določitve, ki bi lahko bile potrebne za ustrezno oceno strupenosti vključujejo analize lipidov, hormonov, kislinsko-bazično ravnovesje, methemoglobina in aktivnost holinesteraze. Po potrebi je mogoče opraviti dodatne klinično biokemijske preiskave, da bi se razširilo raziskavo opaženih učinkov.

(d) Analize urina ni treba opravljati rutinsko, ampak samo takrat, kadar gre za indikacije, ki temeljijo na pričakovani ali opaženi strupenosti.

Če so predhodni podatki normalnih vrednosti neustrezni, je treba pozornost usmeriti na hematološke in klinično biokemijske parametre pred začetkom dajanja odmerkov.

Makroskopska nekropsija

Na vseh živalih je treba opraviti temeljito makroskopsko nekropsijo, ki vključuje pregled zunanje površine telesa, vseh telesnih odprtin ter lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Jetra, ledvice, nadledvične žleze in moda je treba čim prej po seciranju, še vlažne, stehtati, da se izognemo izsušitvi.

Naslednje organe in tkiva je treba ohraniti v ustreznem mediju za morebitne poznejše histopatološke preiskave: vse vidne lezije, možgane – vključno z deli podaljšane hrbtenjače/ponsa, skorjo malih možganov in možgansko skorjo, hipofizo, ščitnico/obščitnico in tkivo priželjca, sapnik in pljuča, srce, aorto, (žleze slinavke), jetra, vranico, ledvice, nadledvične žleze, trebušno slinavko, spolne žleze, maternico (pomožni spolni organi), (kožo), požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danko, sečni mehur, reprezentativni limfni vozel, (mlečna žleza samic), (stegensko mišičevje), periferni živec, prsnico s kostnim mozgom, (oči), (stegnenico, vključno s površino sklepa), (hrbtenjača na treh ravneh – vratni, prsni in ledveni) in (eksorbitalne žlezne solznice). Tkiva, navedena v oklepajih, je treba pregledati le, če kažejo znake strupenosti ali če gre za indikacijo, da so to ciljni organi.

Histopatološka preiskava

(a) Popolno histopatološko preiskavo je treba opraviti na organih in tkivih živali v kontrolni skupini in skupini z visokim odmerkom.

(b) Pregledati je treba vse vidne lezije.

(c) Ciljne organe je treba pregledati v skupinah z drugimi odmerki.

(d) Na pljučih živali iz skupin z nižjimi in srednje velikimi odmerki je treba opraviti histopatološko preiskavo, da bi se odkrilo znake okužbe, ker je tako mogoče ustrezno oceniti zdravstveno stanje živali. Upoštevati je treba tudi histopatološko preiskavo jeter in ledvic v teh skupinah. Nadaljnje histopatološke preiskave na živalih v teh skupinah verjetno ne bodo potrebne na rutinski osnovi, vedno pa se morajo opraviti na organih, ki kažejo znake lezij v skupini z visokim odmerkom.

(e) Kadar je uporabljena satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so prepoznani učinki v preskusnih skupinah.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, pri katerih so opažene lezije in odstotek živali, ki kažejo določen tip lezije. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,

— preskusni pogoji,

— velikosti odmerka (vključno z nosilcem, če je ta uporabljen) in koncentracije,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku,

[1] Danes poznana kot serumska alanin aminotransferaza.
[2] Danes poznana kot serumska aspartat aminotransferaza.

— če je možno, velikost odmerka, pri katerem ni opaženega učinka,
— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,
— opis strupenih ali drugih učinkov,
— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,
— podatki o hrani in telesni masi,
— oftalmološke ugotovitve,
— opravljeni hematološki preskusi in vsi rezultati,
— opravljeni klinično biokemijski preskusi in vsi rezultati (vključno z rezultati vsake analize urina),
— ugotovitve nekropsije,
— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,
— statistična obdelava rezultatov, kadar je to primerno,
— obravnava rezultatov,
— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS SUBKRONIČNE ORALNE STRUPENOSTI

90-DNEVNI PRESKUS S PONOVLJENIMI ORALNIMI ODMERKI NA NEGLODALCIH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se daje dnevno, oralno, v graduiranih odmerkih nekaj skupinam preskusnih živali (neglodalci), po en odmerek na skupino v obdobju 90 dni. V obdobju dajanja se živali opazujejo dnevno, da bi se odkrilo znake strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi nekropsija, po zaključku preskusa pa se nekropsija opravi tudi na preživelih živalih.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine.

Preskusna snov se lahko daje s hrano, lahko pa je bolj ustrezno tudi dajanje v kapsulah. Uporabiti je mogoče tudi druge načine oralnega dajanja. Vsem živalim je treba dajati odmerke z enako metodo tekom celotnega preskusnega obdobja. Če se za lažje dajanje odmerkov uporabi nosilec ali drugi dodatki, se je treba prepričati, da le-ti ne povzročajo strupenih učinkov. Če je ustrezno, se lahko uporabijo pretekli podatki.

Preskusni pogoji

Preskusne živali

Najpogosteje uporabljeni neglodalec je pes, po možnosti točno določene pasme. Uporabijo se lahko tudi druge vrste neglodalcev. Uporabiti je treba mlade, zdrave živali, najboljši čas za začetek dajanja odmerkov v primeru psa je pri štirih do šestih mesecih in najpozneje do devetega meseca starosti. Kadar se preskus subkronične oralne strupenosti izvaja kot predhodnik dolgodobnega preskusa, je treba v obeh preskusih uporabiti isto vrsto/pasmo.

Število in spol

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj osem živali (štiri samice in štiri samce). Število živali ob zaključku študije mora biti ustrezno za pridobitev pomenljive ocene strupenih učinkov.

Velikosti odmerka

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerka in kontrolo. Razen tretiranja s preskusno snovjo, je treba z živalmi v kontrolni skupini ravnati na popolnoma enak način kot z živalmi iz preskusne skupine. Najvišja velikost odmerka naj bi povzročila strupene učinke, vendar ne sme povzročiti smrtnih primerov. Najnižja velikost odmerka ne sme povzročiti nikakršnih strupenih učinkov. Kadar je na razpolago uporabna ocena izpostavljenosti človeka, mora najnižja velikost odmerka to presegati. V najboljšem primeru bi morala srednja velikost odmerka povzroči minimalne opazne strupene učinke. Če je uporabljena več kot ena srednja velikost odmerka, je treba te velikosti razporediti tako, da dobimo stopnjevanje strupenih učinkov.

V skupinah z nizkim in srednjim odmerkom ter v kontrolnih skupinah ne sme biti nobenih smrtnih primerov. V primeru snovi z nizko strupenostjo je pomembno zagotoviti, da količine preskusne snovi, dane s hrano, ne sovpadajo z normalno prehrano.

Kadar se preskusna snov daje s hrano, se lahko uporabi ali konstantna koncentracija v hrani (ppm ali mg/kilogram hrane) ali konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali; uporabljeni izbor je treba natančno opredeliti.

Kadar se odmerek daje direktno, na primer s kapsulo, ga je treba dati vsak dan ob približno enakem času in po potrebi prilagajati v tedenskih časovnih presledkih, da se ohrani konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali.

Kadar se subkronični preskus izvaja kot predhodnik dolgodobnemu preskusu, je treba v obeh študijah uporabiti podobno hrano.

Mejni preskus

Če 90-dnevna študija, opravljena v skladu s spodaj obrazloženo metodo, pri odmerku velikosti 1 000 mg/kilogram telesne mase/dan, ali pri višji velikosti odmerka, povezani z možno izpostavljenostjo človeka, kadar je ta poznana, ne pokaže nikakršnih znakov strupenih učinkov, nadaljnji preskusi verjetno ne bodo potrebni. V primeru snovi z nizko strupenostjo je pomembno zagotoviti, da količine in druge lastnosti uporabljene preskusne snovi, dane s hrano, ne sovpadajo z normalnimi prehrambnimi zahtevami.

Čas opazovanja

Vse živali je treba dnevno opazovati in beležiti znake strupenosti vključno s časom njihovega nastopa, stopnjo in trajanjem. Zabeležiti je treba čas smrti in čas, ko se znaki strupenosti pojavijo in izginejo.

Postopek

Najprimerneje je, da se živalim odmerek preskusne snovi daje sedem dni na teden v obdobju 90 dni. Na podlagi praktičnih ocen, kadar se snov daje drugače, ne s hrano, pa je sprejemljivo tudi dajanje odmerkov pet dni v tednu.

Opazovanje naj vključuje, vendar naj se ne omejuje le na spremembe na koži in krznu, na očeh in sluznicah ter v dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba meriti porabo hrane (in porabo vode, kadar se preskusna snov daje s pitno vodo) in živali vsak teden stehtati.

Temeljit klinični pregled živali je treba opraviti vsak dan z ustreznimi ukrepi, da se čimbolj zmanjša izguba živali med preskusom. Na koncu obdobja izpostavljenosti se na vseh preživelih živalih opravi nekropsija. Umirajoče živali je treba odstraniti in opraviti nekropsijo takoj, ko je to opaženo.

Naslednji pregledi se običajno opravijo na vseh živalih, vključno s kontrolnimi skupinami:

(a) Oftalmološki pregled z uporabo oftalmoskopa ali podobne ustrezne opreme je treba opraviti pred dajanjem preskusne snovi in ob zaključku študije, po možnosti na vseh živalih, najmanj pa na skupinah z visokim odmerkom in kontrolnih skupinah. Če se odkrijejo spremembe v očeh, je treba pregledati vse živali.

(b) Hematološko preiskavo, vključno s hematokritom, koncentracijo hemoglobina, številom eritrocitov, skupnim in diferencialnim številom levkocitov ter merjenjem zmožnosti koagulacije, kot je čas koagulacije, protrombinski čas, tromboplastinski čas ali število trombocitov, je treba opraviti na začetku preskusnega obdobja, potem pa bodisi vsak mesec bodisi sredi preskusnega obdobja, ter končno še na koncu preskusnega obdobja.

(c) Klinično biokemijsko določitev na krvi je treba izvesti na začetku preskusnega obdobja, potem pa bodisi v mesečnih časovnih presledkih bodisi sredi preskusnega obdobja, ter končno še na koncu preskusnega obdobja. Preskusna področja, ki štejejo za ustrezna vsem študijam, so ravnovesje elektrolitov, presnova ogljikovih hidratov, delovanje jeter in ledvic. Izbor določenih preskusov bo odvisen od opazovanj načina delovanja snovi. Predlagane določitve so: meritve kalcija, fosforja, klora, natrija, kalija, glukoze na tešče (z obdobjem teščosti, ustreznim za posamezno vrsto/pasmo), serumske glutaminske piruvične transaminaze ([1]), serumske glutaminske oksaloacetne transaminaze ([2]), ornitin-dekarboksilaze, gama-glutamil-transpeptidaze, sečnine, albumina, kreatinina v krvi, skupnega bilirubina in skupnih serumskih proteinov. Druge

([1]) Danes poznana kot serumska alanin aminotransferaza.
([2]) Danes poznana kot serumska aspartat aminotransferaza.

določitve, ki bi lahko bile potrebne za ustrezno oceno strupenosti vključujejo analize lipidov, hormonov, kislinsko-bazičnega ravnovesja, methemoglobina in aktivnost holinesteraze. Po potrebi je mogoče opraviti dodatne klinično biokemijske preiskave, da bi se razširilo raziskavo opaženih učinkov. Neglodalci naj bodo, preden se jim vzame vzorce krvi, nekaj časa tešči (ne dlje kot 24 ur).

(d) Analize urina ni treba opravljati rutinsko, ampak samo takrat, kadar gre za indikacije, ki temeljijo na pričakovani ali opaženi strupenosti.

Makroskopska nekropsija

Na vseh živalih je treba opraviti temeljito makroskopsko nekropsijo, ki vključuje pregled zunanje površine telesa, vseh telesnih odprtin ter lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Jetra, ledvice, nadledvične žleze, ščitnica (z obščitnicami) in moda je treba čim prej po seciranju, še vlažne, stehtati, da se izognemo izsušitvi.

Naslednje organe in tkiva je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitne poznejše histopatološke preiskave: vse vidne lezije, možgane – vključno z deli podaljšane hrbtenjače/mosta, skorjo malih možganov in možgansko skorjo, hipofizo, ščitnico/obščitnico in tkivo priželjca, (sapnik), pljuča, srce, aorto, žleze slinavke, jetra, vranico, ledvice, nadledvične žleze, trebušno slinavko, spolne žleze, maternico (pomožne spolne organe), (kožo), žolčnik, požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danko, sečni mehur, reprezentativni limfni vozel, (mlečno žlezo samic), (stegensko mišičevje), periferne živce, (oči), prsnico s kostnim mozgom, (stegnenico, vključno s površino sklepa) in (hrbtenjačo na treh ravneh – vratni, prsni in ledveni). Tkiva, navedena v oklepajih, je treba pregledati le, če kažejo znake strupenosti ali če gre za indikacijo, da so to ciljni organi.

Histopatološka preiskava

Temeljito histopatološko preiskavo je treba opraviti na organih in tkivih živali v kontrolni skupini in skupini z visokim odmerkom. Nadaljnje histopatološke preiskave v skupinah z drugimi odmerki je treba opraviti na organih, ki kažejo lezije v skupini z visokim odmerkom, ali če klinična opazovanja pokažejo, da je zanje to potrebno.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, pri katerih so opažene lezije, tipe lezij, in odstotek živali, ki kažejo določen tip lezije. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta/pasma ali sev, vir, okoljski pogoji, hrana,

— preskusni pogoji,

— velikosti odmerka (vključno z nosilcem, če je ta uporabljen) in koncentracije,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku,

— če je možno, velikost odmerka, pri kateri ni opaženega učinka,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,

— opis strupenosti ali drugih učinkov (s posebno pozornostjo na kliničnih odkritjih)

— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o hrani in telesni masi,

— oftalmološke ugotovitve,

— opravljeni hematološki preskusi in vsi rezultati,
— opravljeni klinično biokemijski preskusi in vsi rezultati (vključno z rezultati vsake analize urina),
— ugotovitve nekropsije,
— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,
— statistična obdelava rezultatov, kadar je to primerno,
— obravnava rezultatov,
— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

ŠTUDIJA SUBKRONIČNE STRUPENOSTI V STIKU S KOŽO

90-DNEVNA ŠTUDIJA S PONOVLJENIM DERMALNIM ODMERKOM NA GLODALCIH

1. **METODA**

1.1 **Uvod**

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 **Opredelitev pojmov**

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 **Referenčne snovi**

Jih ni.

1.4 **Princip preskusne metode**

Preskusna snov se daje dnevno na kožo v graduiranih odmerkih nekaj skupinam preskusnih živali, po en odmerek na skupino v obdobju 90 dni. V obdobju dajanja se živali opazujejo dnevno, da bi se odkrilo znake strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi nekropsija, po zaključku preskusa pa se nekropsija opravi tudi na preživelih živalih.

1.5 **Merila kakovosti**

Jih ni.

1.6 **Opis preskusne metode**

Priprave

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine. Pred samim preskusom se na hrbtnem predelu telesa preskusnih živali ostriže krzno. Lahko se ga obrije, vendar je treba to opraviti približno 24 ur pred preskusom. Živalim je običajno treba krzno ponovno ostriči ali obriti približno v tedenskih časovnih presledkih. Med striženjem ali britjem krzna je treba paziti, da se ne odrgne kožo. Za nanos preskusne snovi je treba očistiti najmanj 10 % telesne površine. Pri odločitvi o področju, ki ga je treba očistiti, in velikosti pokrivala, je treba upoštevati maso živali. Pri preskušanju trdnih snovi, ki jih je, kadar je primerno, mogoče uprašiti, je treba preskusno snov dovolj navlažiti z vodo ali, kadar je potrebno, ustreznim nosilcem, da se zagotovi dober stik s kožo. Tekoče preskusne snovi se ponavadi uporabljajo nerazredčene. Snovi se nanaša vsak dan pet do sedem dni na teden.

Preskusni pogoji

Preskusne živali

Uporabijo se odrasla podgana, kunec ali morski prašiček. Mogoče je uporabiti tudi druge vrste, vendar je njihovo uporabo treba utemeljiti. Na začetku preskusa nihanje v teži ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti. Kadar se subkronična dermalna študija izvaja kot predhodnica dolgodobne študije, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto in sev.

Število in spol

Za vsako velikost odmerka je treba uporabiti najmanj 20 živali (10 samic in 10 samcev) z zdravo kožo. Samice naj bodo nuliparne in nebreje. Če so načrtovana vmesna žrtvovanja, je treba število povečati za število živali, ki naj bi bile žrtvovane še pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko satelitsko skupino 20 živali (10 živali na spol) tretira z odmerkom visoke velikosti 90 dni in na njih v 28 dneh po tretiranju opazuje povratnost, obstojnost ali zapozneli pojav strupenih učinkov.

Velikosti odmerka

Zahtevane so najmanj tri velikosti odmerka s kontrolno skupino ali kontrolno skupino nosilca, v kolikor je uporabljen nosilec. Čas izpostavljenosti naj traja najmanj šest ur na dan. Preskusno snov je treba nanesti vsak dan približno ob enakem času, količino nanesene snovi pa prilagajati v časovnih presledkih (tedensko ali dvotedensko), da se ohrani konstantna velikost odmerka glede na telesno maso živali. Razen tretiranja s preskusno snovjo je treba z živalmi v kontrolni skupini ravnati na popolnoma enak način kot z živalmi iz preskusne skupine. Kadar se za lažje dajanje odmerkov uporabi nosilec, ga je treba na kontrolni skupini odmeriti na enak način kot na preskusnih skupinah, odmerek nosilca pa naj bo enak, kot pri preskusni skupini z najvišjo velikostjo odmerka. Najvišja velikost odmerka bi morala povzročiti strupene učinke, vendar sme povzročiti malo oziroma nobenega smrtnega primera. Najnižja velikost odmerka ne sme povzročiti nikakršnih znakov strupenosti. Kadar je na razpolago uporabna ocena izpostavljenost človeka, mora najnižja velikost to presegati. V najboljšem primeru mora srednja velikost odmerka povzročiti minimalne opazne strupene učinke. Če je uporabljena več kot ena srednja velikost odmerka, je treba te velikosti razporediti tako, da dobimo stopnjevanje strupenih učinkov. Za pomenljivo oceno rezultatov mora biti pojav smrtnih primerov v skupinah z nizkim in srednjim odmerkom ter v kontrolnih skupinah nizek.

Če nanos preskusne snovi povzroči hudo vnetje kože, je treba koncentracijo zmanjšati, kar ima lahko za posledico zmanjšanje ali odsotnost strupenih učinkov pri visoki velikosti odmerka. Če je koža hudo poškodovana, bo morda treba zaključiti študijo in začeti novo študijo z nižjimi koncentracijami.

Mejni preskus

Če predhodna študija pri velikosti odmerka 1 000 mg/kilogram, ali pri višji velikosti odmerka, povezani z možno izpostavljenostjo človeka, kadar je ta poznana, ne pokaže nikakršnih znakov strupenih učinkov, nadaljnji preskusi verjetno ne bodo potrebni.

Čas opazovanja

Preskusne živali je treba dnevno opazovati, da bi se odkrili znaki strupenosti. Zabeležiti je treba čas smrti in čas, ko se znaki strupenosti pojavijo in izginejo.

Postopek

Živali je treba hraniti v kletkah vsako posebej. Najprimerneje je, da se živalim odmerek preskusne snovi daje sedem dni na teden, v obdobju 90 dni.

Živali iz katere koli satelitske skupine, za katero so načrtovana nadaljnja opazovanja, je treba ohranjati še nadaljnjih 28 dni brez tretiranja, da bi se odkrilo okrevanje ali obstojnost strupenih učinkov. Čas izpostavljenosti naj bo šest ur na dan.

Preskusno snov je treba nanesti enakomerno na območje, ki znaša približno 10 % celotne telesne površine. V primeru zelo strupene snovi je lahko površina pokritosti manjša, vendar mora kljub temu biti v celoti pokrita s čim tanjšo in čim bolj enakomerno plastjo.

V času izpostavljenosti se preskusna snov ohranja v stiku s kožo s porozno obvezo iz gaze in lepilnim trakom, ki ne draži kože. Preskusno območje je treba še dodatno pokriti na primeren način, da se obvezo iz gaze in preskusno snov obdrži na mestu ter zagotovi, da živali ne morejo zaužiti preskusne snovi. Za preprečitev zaužitja preskusne snovi je mogoče uporabiti opremo, ki omejuje gibanje živali, vendar pa popolna imobilizacija ni priporočljiva metoda.

Na koncu obdobja izpostavljenosti se, kjer je mogoče, odstrani ostanke preskusne snovi z vodo ali s kakšno drugo ustrezno metodo čiščenja kože.

Vse živali je treba dnevno opazovati in beležiti znake strupenosti vključno s časom njihovega nastopa, stopnjo in trajanjem. Opazovanje v kletkah naj vključuje opazovanje sprememb na koži in krznu, v očeh in sluznicah ter v dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba meriti porabo hrane in živali vsak teden stehtati. Redno opazovanje živali je potrebno, da se zagotovi, da med preskusom ne pride do izgube živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napačne postavitve. Na koncu preskusnega obdobja se na vseh preživelih živalih iz nesatelitske preskusne skupine opravi nekropsija. Umirajoče živali je treba odstraniti in opraviti nekropsijo takoj, ko je to opaženo.

Naslednji pregledi se običajno opravijo na vseh živalih, vključno s kontrolnimi skupinami:

(a) Oftalmološki pregled z uporabo oftalmoskopa ali podobne ustrezne opreme je treba opraviti pred dajanjem preskusne snovi in ob zaključku študije, po možnosti na vseh živalih, najmanj pa na skupinah z visokim odmerkom in kontrolnih skupinah. Če se odkrijejo spremembe v očeh, je treba pregledati vse živali.

(b) Hematološko preiskavo, vključno s hematokritom, koncentracijo hemoglobina, številom eritrocitov, skupnim in diferencialnim številom levkocitov ter merjenjem zmožnosti koagulacije, kot je čas koagulacije, protrombinski čas, tromboplastinski čas ali število trombocitov, je treba opraviti na koncu preskusnega obdobja.

(c) Klinično biokemijsko določitev na krvi je treba izvesti na koncu preskusnega obdobja. Preskusna področja, ki štejejo za ustrezna vsem študijam, so ravnovesje elektrolitov, presnova ogljikovih hidratov, delovanje jeter in ledvic. Izbor določenih preskusov bo odvisen od opazovanj načina delovanja snovi. Predlagane določitve so meritve kalcija, fosforja, klora, natrija, kalija, glukoze na tešče (z obdobjem teščosti, ustreznim za posamezno vrsto), serumske glutaminske piruvične transaminaze ([1]), serumske glutaminske oksaloacetat transaminaze ([2]), ornitin-dekarboksilaze, gama-glutamil-transpeptidaze, sečnine, albumina, kreatinina v krvi, skupnega bilirubina in skupnih serumskih proteinov

Druge določitve, ki bi lahko bile potrebne za ustrezno oceno strupenosti vključujejo analize lipidov, hormonov, kislinsko-bazično ravnovesje, methemoglobina in aktivnost holinesteraze. Po potrebi je mogoče opraviti dodatne klinično biokemijske preiskave, da bi se razširilo raziskavo opaženih učinkov.

(d) Analize urina ni treba opravljati rutinsko, ampak samo takrat, kadar gre za indikacije, ki temeljijo na pričakovani ali opaženi strupenosti.

Če so predhodni podatki normalnih vrednosti neustrezni, je treba pozornost usmeriti na hematološke in klinično biokemijske parametre pred začetkom dajanja odmerkov.

Makroskopska nekropsija

Na vseh živalih je treba opraviti temeljito makroskopsko nekropsijo, ki vključujejo pregled zunanje površine telesa, vseh telesnih odprtin ter lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Jetra, ledvice, nadledvične žleze in moda je treba čim prej po seciranju, še vlažne, stehtati, da se izognemo izsušitvi. Naslednje organe in tkiva je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitne nadaljnje histopatološke preiskave: vse vidne lezije, možgane – vključno z deli podaljšane hrbtenjače/mosta, skorjo malih možganov in možgansko skorjo, hipofizo, ščitnico/obščitnico in tkivo priželjca, (sapnik), pljuča, srce, aorto, žleze slinavke, jetra, vranico, ledvice, nadledvične žleze, trebušno slinavko, spolne žleze, maternico, pomožne spolne organe, žolčnik (če je prisoten), požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danko, sečni mehur, reprezentativni limfni vozel, (mlečno žlezo samic), (stegensko mišičevje), periferni živec, (oči), (prsnico s kostnim mozgom), (stegnenica, vključno s površino sklepa), (hrbtenjačo na treh ravneh – vratni, prsni in ledveni) in (eksorbitalne žlezne solznice). Tkiva, navedena v oklepajih, je treba pregledati le, če kažejo znake strupenosti ali če gre za indikacijo, da so to ciljni organi.

Histopatološka preiskava

(a) Popolno histopatološko preiskavo je treba opraviti na normalni in tretirani koži ter organih in tkivih živali v kontrolni skupini in skupini z visokim odmerkom.

(b) Pregledati je treba vse vidne lezije.

(c) Pregledati je treba ciljne organe v skupinah z drugimi odmerki.

(d) Kadar so uporabljene podgane, je treba na pljučih živali iz skupin z nižjimi in srednje velikimi odmerki opraviti histopatološko preiskavo, da bi se odkrili znaki okužbe, saj se tako lahko ustrezno oceni zdravstveno stanje živali. Nadaljnje histopatološke preiskave na živalih v teh skupinah verjetno ne bodo potrebne na rutinski osnovi, vedno pa se morajo opraviti na organih, ki pokažejo znake lezij v skupini z visokim odmerkom.

(e) Kadar je uporabljena satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so v preskusnih skupinah opazni učinki.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, pri katerih so opažene lezije, tipe lezij, in odstotek živali, ki kažejo določen tip lezije. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

([1]) Danes poznana kot serumska alanin aminotransferaza.
([2]) Danes poznana kot serumska aspartat aminotransferaza.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,
— preskusni pogoji,
— velikosti odmerka (vključno z nosilcem, če je ta uporabljen) in koncentracije,
— podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku,
— če je možno, velikost odmerka, pri kateri ni opaženega učinka,
— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,
— opis strupenih ali drugih učinkov,
— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,
— podatki o hrani in telesni masi,
— oftalmološke ugotovitve,
— opravljeni hematološki preskusi in vsi rezultati,
— opravljeni klinični biokemijski preskusi in vsi rezultati (vključno z rezultati vsake analize urina),
— ugotovitve nekropsije,
— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,
— statistična obdelava rezultatov, kadar je to mogoče,
— obravnava rezultatov,
— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

ŠTUDIJA SUBKRONIČNE INHALACIJSKE STRUPENOSTI

90-DNEVNA ŠTUDIJA S PONOVLJENIM INHALACIJSKIM ODMERKOM NA GLODALCIH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Več skupin preskusnih živali se za določeno obdobje dnevno izpostavi preskusni snovi v graduiranih koncentracijah, pri čemer se uporablja ena koncentracija na skupino v obdobju 90 dni. Kadar je uporabljen nosilec, ki pomaga sproščati ustrezno koncentracijo preskusne snovi v ozračje, je treba uporabiti kontrolno skupino za nosilec. V obdobju dajanja se živali opazujejo dnevno, da bi se odkrilo znake strupenosti. Na živalih, ki med preskusom poginejo, se opravi nekropsija, po zaključku preskusa pa se nekropsija opravi tudi na preživelih živalih.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine. Kadar je potrebno, se lahko preskusni snovi doda ustrezni nosilec, ki pomaga sproščati ustrezno koncentracijo snovi v ozračje. Če je za lažje odmerjanje uporabljen nosilec ali drugi dodatki, se je treba prepričati, da le-ti ne povzročajo strupenih učinkov. Če je ustrezno, se lahko uporabi pretekle podatke.

Preskusni pogoji

Preskusne živali

Če ni kontraindikacij, je priporočena vrsta podgana. Uporabiti je treba splošno uporabljene laboratorijske seve mladih zdravih živali. Na začetku študije nihanje v teži uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % ustrezne srednje vrednosti. Kadar se subkronična inhalacijska študija izvaja kot predhodnica dolgodobni študiji, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto in sev.

Število in spol

Za vsako koncentracijo izpostavljenosti je treba uporabiti najmanj 20 živali (10 samic in 10 samcev). Samice naj bodo nuliparne in nebreje. Če so načrtovana vmesna žrtvovanja, je treba število povečati za število živali, ki naj bi bile žrtvovane še pred zaključkom študije. Poleg tega se lahko satelitsko skupino 20 živali (10 živali na spol) tretira z odmerkom visoke velikosti 90 dni in na njih v 28 dneh po tretiranju opazuje povratnost, obstojnost ali zapozneli pojav strupenih učinkov.

Koncentracije izpostavljenosti

Zahtevane so najmanj tri koncentracije, s kontrolno skupino ali kontrolno skupino nosilca (ki ustreza koncentraciji nosilca pri najvišji koncentraciji), v kolikor je nosilec uporabljen. Razen tretiranja s preskusno snovjo je treba z živalmi v kontrolni skupini ravnati na popolnoma enak način kot z živalmi iz preskusne skupine. Najvišja koncentracija bi morala povzročiti strupene učinke, vendar malo oziroma nobenega smrtnega primera. Kadar je na voljo uporabna ocena izpostavljenosti človeka, mora najnižja velikost to presegati. V najboljšem primeru mora srednja koncentracija povzroči minimalne opazne strupene učinke. Če je uporabljena več kot ena srednja koncentracija, je treba te koncentracije razporediti tako, da dobimo stopnjevanje strupenih učinkov. Za pomenljivo oceno rezultatov mora biti pojav smrtnih primerov v skupinah z nizko in srednjo koncentracijo ter v kontrolnih skupinah nizek.

Čas izpostavljenosti

Dnevna izpostavljenost naj traja šest ur po uravnoteženju koncentracij v komorah. Za izpolnitev posebnih zahtev je mogoče čas izpostavljenosti podaljšati ali skrajšati.

Oprema

Preskus se na živalih izvede v napravah za inhalacijo, ki so oblikovane tako, da ohranijo dinamičen pretok zraka z najmanj 12 spremembami zraka na uro, s čimer se zagotovi ustrezna vsebnost kisika in enakomerno porazdeljeno ozračje izpostavljenosti. Kadar je uporabljena komora, naj bo oblikovana tako, da bo natrpanost s preskusnimi živalmi minimalna, njihova izpostavljenost z inhalacijo preskusne snovi pa maksimalna. Na splošno velja, da naj za zagotovitev stabilnosti ozračja v komori skupna količina preskusnih živali ne presega 5 % prostornine preskusne komore. Uporabiti je mogoče komore, v katerih so živali izpostavljene samo z usti in nosom, z glavo ali s celotnim telesom; pri prvih dveh je vnos preskusne snovi po drugih poteh minimalno.

Čas opazovanja

Preskusne živali je treba dnevno opazovati, da bi se odkrili znaki strupenosti, med celotnim obdobjem tretiranja in okrevanja. Zabeležiti je treba čas smrti in čas, ko se znaki strupenosti pojavijo in izginejo.

Postopek

Živali se izpostavijo preskusni snovi dnevno, pet do sedem dni na teden, za obdobje 90 dni. Živali iz katere koli satelitske skupine, za katero so načrtovana nadaljnja opazovanja, je treba ohranjati še nadaljnjih 28 dni brez tretiranja, da bi se odkrilo okrevanje ali obstojnost strupenih učinkov. Temperaturo, pri kateri se preskus izvaja, je treba ohranjati na 22 ± 3 °C. Relativno vlažnost je najprimerneje ohranjati med 30 % in 70 %, toda v nekaterih primerih (npr. preskušanje aerosolov) to ni izvedljivo. Med izpostavljenostjo je treba odvzeti hrano in vodo.

Uporabiti je treba dinamični inhalacijski sistem z ustreznim analitskim kontrolnim sistemom koncentracije. Priporočljiv je poskusni preskus, da se določijo ustrezne koncentracije izpostavljenosti. Dotok zraka je treba prilagoditi, da bi se zagotovilo homogene pogoje po vsej komori. Sistem naj zagotovi kar najhitrejšo vzpostavitev stabilnih pogojev izpostavljenosti.

Meritve ali spremljanje naj zajema:

(a) Stopnjo pretoka zraka (neprekinjeno);

(b) Dejansko koncentracijo preskusne snovi, merjeno v dihalnem območju. Med vsakodnevno izpostavljenostjo naj koncentracija ne odstopa za več kot ± 15 % od srednje vrednosti. Vendar pa v primeru prahu in aerosolov ta raven kontrole ni nujno dosegljiva, zato je sprejemljiv širši razpon. V obdobju celotnega trajanja študije naj bodo vsakodnevne koncentracije, kolikor je to mogoče, konstantne. Med razvijanjem sistema sproščanja, je treba opraviti analizo velikosti delcev, da bi se določila stabilnost koncentracij aerosola. Med izpostavljenostjo se, kadar je to potrebno, izvede analiza za ugotovitev doslednosti porazdelitve velikosti delcev;

(c) Temperatura in vlažnost;

(d) med izpostavljenostjo in po njej potekajo opazovanja in se sistematično beležijo; podatke je treba beležiti za vsako posamezno žival posebej. Vse živali je treba dnevno opazovati in beležiti znake strupenosti vključno s časom njihovega nastopa, stopnjo in trajanjem. Opazovanja v kletkah naj vključujejo: spremembe na koži in krznu, v očeh, sluznicah, dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba meriti porabo hrane in živali vsak teden stehtati. Redno opazovanje živali je potrebno da se zagotovi, da med študijo ne pride do izgube živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napačne postavitve. Na koncu obdobja izpostavljenosti, se na vseh preživelih živalih opravi nekropsija. Umirajoče živali je treba odstraniti in opraviti nekropsijo takoj, ko je to opaženo.

Naslednji pregledi se običajno opravijo na vseh živalih, vključno s kontrolnimi skupinami:

(a) Oftalmološki pregled z uporabo oftalmoskopa ali podobne ustrezne opreme je treba opraviti pred izpostavitvijo preskusni snovi in ob zaključku študije, po možnosti na vseh živalih, najmanj pa na skupinah z visokim odmerkom in kontrolnih skupinah. Če se odkrijejo spremembe v očeh, je treba pregledati vse živali;

(b) Hematološko preiskavo, vključno s hematokritom, koncentracijo hemoglobina, številom eritrocitov, skupnim in diferencialnim številom levkocitov ter merjenjem zmožnosti koagulacije, kot je čas koagulacije, protrombinski čas, tromboplastinski čas ali število trombocitov, je treba opraviti na koncu preskusnega obdobja;

(c) Klinično biokemijsko določitev na krvi je treba izvesti na koncu preskusnega obdobja. Preskusna področja, ki štejejo za ustrezna vsem študijam, so ravnovesje elektrolitov, presnova ogljikovih hidratov, delovanje jeter in ledvic. Izbor določenih preskusov bo odvisen od opazovanj načina delovanja snovi. Predlagane določitve so meritve kalcija, fosforja, klora, natrija, kalija, glukoze na tešče (z obdobjem teščosti, ustreznim za posamezno vrsto), serumske glutaminske piruvične transaminaze ([1]), serumske glutaminske oksaloacetat transaminaze ([2]), ornitin-dekarboksilaze, gama-glutamil-transpeptidaze, sečnine, albumina, kreatinina v krvi, skupnega bilirubina in skupnih serumskih proteinov. Druge določitve, ki bi lahko bile potrebne za ustrezno oceno strupenosti vključujejo analize lipidov, hormonov, ravnovesja kislinsko-bazično ravnovesje, methemoglobina in aktivnost holinesteraze. Po potrebi je mogoče opraviti dodatne klinično biokemijske preiskave, da bi se razširilo raziskavo opaženih učinkov.

(d) Analize urina ni treba opravljati rutinsko, ampak samo takrat, kadar gre za indikacijo, ki temelji na pričakovani ali opaženi strupenosti.

Če so predhodni podatki normalnih vrednosti neustrezni, je treba pozornost usmeriti na hematološke in klinično biokemijske parametre pred začetkom dajanja odmerkov.

Makroskopska nekropsija

Na vseh živalih je treba opraviti popolno makroskopsko nekropsijo, ki vključuje pregled zunanje površine telesa, vseh telesnih odprtin ter lobanjske, prsne in trebušne votline ter njihove vsebine. Jetra, ledvice, nadledvične žleze, ščitnica (in obščitnice) in moda je treba čim prej po seciranju, še vlažne, stehtati, da se izognemo izsušitvi. Naslednje organe in tkiva je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitne poznejše histopatološke preiskave: vse vidne lezije, pljuča – ki jih je treba odstraniti nepoškodovana, stehtati in obdelati z ustreznim fiksirjem, da se zagotovi ohranjenost pljučne strukture (oblivanje s fiksativom velja za učinkovit postopek), tkiva nosu in žrela, možgani – vključno z deli podaljšane hrbtenjače/mosta, skorjo malih možganov in možgansko skorjo, hipofizo, ščitnico/obščitnic in tkivo priželjca, sapnik, pljuča, srce, aorto, žleze slinavke, jetra, vranico, ledvice, nadledvične žleze, trebušno slinavko, maternico (pomožne spolne organe), (kožo), žolčnik (če je prisoten), požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danka, sečni mehur, reprezentativni limfni vozel, (mlečno žleza samic), (stegensko mišičevje), periferni živec, (oči), prsnico s kostnim mozgom, (stegnenico, vključno s površino sklepa) in (hrbtenjačo na treh ravneh – vratni, prsni in ledveni). Tkiva, navedena v oklepajih, je treba pregledati le, če kažejo znake strupenosti ali če gre za indikacijo, da so to ciljni organi.

Histopatološka preiskava

(a) Popolno histopatološko preiskavo je treba opraviti na dihalih in drugih organih in tkivih vseh živali v kontrolni skupini in skupini z visokim odmerkom.

(b) Pregledati je treba vse vidne lezije.

(c) Pregledati je treba ciljne organe v skupinah z drugimi odmerki.

(d) Pljuča živali iz skupin z nižjimi in srednje velikimi odmerki je treba prav tako izpostaviti histopatološki preiskavi, saj se tako lahko ustrezno oceni zdravstveno stanje živali. Nadaljnje histopatološke preiskave na živalih v teh skupinah verjetno ne bodo potrebne na rutinski osnovi, vedno pa se morajo opraviti na organih, na katerih so v skupini z visokim odmerkom opazni znaki lezij.

(e) Kadar je uporabljena satelitska skupina, je treba opraviti histopatološko preiskavo na tkivih in organih, na katerih so v preskusnih skupinah opaženi učinki.

([1]) Danes poznana kot serumska alanin aminotransferaza.
([2]) Danes poznana kot serumska aspartat aminotransferaza.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, na katerih so opažene lezije, tipe lezij, in odstotek živali, ki kažejo določen tip lezije. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoliški pogoji, hrana,

— preskusni pogoji:

Opis aparature za izpostavljenost: vključno z obliko, tipom, dimenzijami, virom zraka, sistemom za sproščanje delcev in aerosolov, metodo klimatiziranja, obdelavo izpušnega zraka in metodo nastanitve živali v preskusne komore, kadar so te uporabljene. Opisati je treba opremo za merjenje temperature, vlažnosti in, kadar je to primerno, stabilnosti koncentracij aerosola ali velikosti delcev.

Podatki o izpostavljenosti: zbrati jih je treba v tabeli in prikazati srednje vrednosti ter meritev nihanj (npr. standardno odstopanje), zajemati pa morajo:

(a) stopnje pretoka zraka skozi naprave za inhalacijo;

(b) temperaturo in vlažnost zraka;

(c) nominalne koncentracije (skupna količina preskusne snovi, dane v napravo za inhalacijo in deljeno s prostornino zraka);

(d) vrsto nosilca, če je ta uporabljen;

(e) dejanske koncentracije na preskusnem dihalnem območju;

(f) mediano velikosti delcev (kjer je to primerno),

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in koncentraciji,

— če je možno, velikost koncentracije, pri kateri ni opaženega učinka,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,

— opis strupenih ali drugih učinkov,

— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o hrani in telesni masi,

— oftalmološke ugotovitve,

— opravljeni hematološki preskusi in rezultati,

— opravljeni klinično biokemijski poskusi in rezultati (vključno z rezultati vsake analize urina),

— ugotovitve nekropsije,

— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov, kadar je to mogoče,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

ŠTUDIJA TERATOGENOSTI – GLODALCI IN NEGLODALCI

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se daje v graduiranih odmerkih ali koncentracijah najmanj v času brejosti, ki zajema obdobje organogeneze, in sicer nekaj skupinam brejih preskusnih živali, pri čemer se uporabi en odmerek na skupino. Tik pred pričakovanim datumom skotitve se samico žrtvuje, odstrani maternico in pregleda vsebino. Ta preskusna metoda zajema embriotoksičnost in fetotoksičnost.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Laboratorijskim pogojem se najmanj pet dni pred preskusom prilagodijo zdrave mlade odrasle samice približno enake starosti in velikosti, ki se še niso parile, nato pa se jih pari s samci z ugotovljeno plodnostjo. Oplojene samice se naključno izberejo in razporedijo v preskusne skupine.

Do parjenja lahko pride po naravni poti ali pa se opravi umetna osemenitev. Preskusna snov se samicam daje dnevno, s čimer se začne tik po ugnezditvi in nadaljuje skozi celotno obdobje organogeneze. Dan pred rokom kotitve se zarodki skotijo s histerektomijo in se pregledajo za visceralne ali skeletne anomalije, vključno z zaostalostjo rasti, pozno osifikacijo in črevesnimi krvavitvami.

Preskusni pogoji

Preskusne živali

Običajno uporabljene vrste so podgana, miš, hrček in kunec. Priporočeni vrsti sta podgana in kunec. Uporabijo naj se splošno uporabljani laboratorijski sevi. Sev ne sme imeti nizke plodnosti, in mora biti karakteriziran glede odziva na teratogene snovi. Živali je treba razvrstiti po kletkah posamezno.

Število in spol

Za vsako velikost odmerka je zahtevanih najmanj 20 brejih samic podgane, miši ali hrčka ali 12 brejih samic kunca. Cilj je zagotoviti dovolj velik zarod in zadostno število mladičev, da se mogoči ocena potencialnega teratogenega učinka snovi.

Velikosti odmerka

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerka in kontrolo. Kadar se preskusna snov daje z nosilcem, je treba uporabiti tudi kontrolno skupino za nosilec. Pri uporabi nosilca je treba poznati njegove toksikološke lastnosti; ta ne sme biti teratogen ali imeti učinkov na razmnoževanje. Razen tretiranja s preskusno snovjo je treba z živalmi v kontrolni skupini(ah) ravnati na popolnoma enak način kot z živalmi iz preskusne skupine. Najvišja

velikost odmerka preskusne snovi, v kolikor ni omejena s fizikalnimi/kemijskimi ali biološkimi lastnostmi snovi, mora v najboljšem primeru povzročiti nekaj očitne maternalne strupenosti, kot je majhna izguba na teži, ne sme pa povzročiti več kot 10 % smrtnih primerov pri materah. Nizka velikost odmerka ne sme sprožiti vidnih učinkov, ki jih je mogoče pripisati preskusni snovi. Srednje velik odmerek ali odmerke je treba geometrično razporediti med visokimi in nizkimi velikostmi odmerka.

Mejni preskus

V primeru snovi z nizko strupenostjo, če odmerek velikosti najmanj 1 000 mg/kilogram ne povzroči nikakršnih znakov embriotoksičnosti ali teratogenosti, nadaljnje študije pri drugih velikostih odmerka verjetno ne bodo potrebne.

Čas izpostavljenosti

Dan 0 v preskusu je dan, ko je opažen vaginalni zamašek in/ali semenčeca (kadar je to izvedljivo). Čas odmerjanja naj se pokriva s časom glavne organogeneze. Pri podganah in miših je to lahko 6. do 15. dan, pri hrčkih 6. do 14. dan ali 6. do 18. dan pri kuncih. Če se na dan 0 opazuje parjenje ali umetna osemenitev, je treba navedene čase prilagoditi tako, da se doda en dan. Lahko pa se čas odmerjanja podaljša na približno en dan pred pričakovanim dnevom kotitve.

Čas opazovanja

Najmanj enkrat na dan je treba opraviti temeljit klinični pregled. Dodatna opazovanja je treba opraviti vsak dan in sprejeti ustrezne ukrepe, da bi bila izguba živali med študijo čim manjša.

Postopek

Preskusno snov se daje oralno z gavažo. Preskusno snov je treba dati vsak dan približno ob istem času.

Samice preskusnih živali se tretirajo s preskusno snovjo vsak dan tekom ustreznega obdobja tretiranja. Odmerek je lahko odvisen od teže samic na začetku dajanja snovi ali pa se, glede na hitro pridobitev na teži v času brejosti živali redno tehta, nakar se odmerek odmeri glede na nazadnje ugotovljeno maso. Znake strupenosti je treba beležiti, kot se jih opazi, vključno s časom nastopa, stopnjo in trajanjem. Samice, ki kažejo znake abortusa ali prezgodnje skotitve, je treba žrtvovati in opraviti temeljit makroskopski pregled. Obdobje opazovanja po tretiranju naj se nadaljuje do približno zadnjega dneva pred rokom skotitve; cilj tega je zajeti večji del obdobja brejosti in izogniti se zapletom pri razlagi rezultatov, do katerih lahko pride po naravni skotitvi. Opazovanja v kletkah naj vključujejo, vendar naj ne bodo omejena na spremembe na koži in krznu, v očeh in sluznicah, ter v dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu. Tedensko je treba meriti porabo hrane. Živali je treba vsak teden stehtati.

Nekropsija

V primeru smrti v času ali na koncu študije je treba samico makroskopsko pregledati za kakršne koli abnormalnosti ali patološke spremembe, ki so lahko vplivale na brejost. Takoj po smrti je treba odstraniti maternico, vsebino pa pregledati za primere smrti zarodka ali ploda ter za število živih zarodkov. Ponavadi je mogoče opredeliti čas smrti *in utero*, kadar gre za tak primer. Pri podganah in kuncih je mogoče določiti število *corpora lutea*. Določiti je treba spol zarodkov in stehtati vsak zarodek posebej, zabeležiti teže ter izračunati povprečno maso zarodka. Po odstranitvi je treba vsak zarodek zunanje pregledati. Pri podganah, miših in hrčkih je treba eno tretjino do ene polovice vsakega zaroda pripraviti in pregledati za skeletne anomalije, preostali del vsakega zaroda pa pripraviti in pregledati za anomalije mehkega tkiva z uporabo ustreznih metod. Pri kuncih se z natančnim seciranjem vsak zarodek pregleda najprej za visceralne anomalije, nato pa še za skeletne anomalije.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število brejih živali, število in odstotke živih zarodkov in zarodke s kakršnimi koli abnormalnostmi mehkega tkiva ali skeletnimi abnormalnostmi ter njihovo povezavo z določenim zarodom. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,
— preskusni pogoji,
— velikosti odmerka (vključno z nosilcem, če je ta uporabljen) in koncentracije,
— podatki o odzivu strupenosti po odmerku,
— če je možno, velikost odmerka, pri kateri ni opaženega učinka,
— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,
— opis strupenih ali drugih učinkov,
— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,
— podatki o hrani in telesni masi,
— trajanje brejosti in podatki o zarodu (vključno s preteklimi podatki),
— podatki o zarodku (živ/mrtev, spol, okvare mehkega tkiva in okvare skeleta),
— podatki o zarodu (živ/mrtev, spol, okvare mehkega tkiva in okvare skeleta za vsak zarod),
— statistična obdelava rezultatov,
— obravnava rezultatov,
— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS KRONIČNE STRUPENOSTI

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se običajno daje sedem dni na teden na ustrezen način nekaj skupinam preskusnih živali, in sicer po en odmerek na skupino večji del življenjske dobe živali. Med in po izpostavljenosti preskusni snovi se živali dnevno opazujejo, da bi se odkrilo znake strupenosti.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine.

Preskusni pogoji

Preskusne živali

Priporočena vrsta je podgana. Na podlagi rezultatov predhodno opravljenih študij je mogoče uporabiti tudi druge vrste (glodalce ali neglodalce). Uporabiti je treba splošno uporabljene laboratorijske seve mladih zdravih živali, dajanje odmerkov pa naj se začne čim prej, potem ko se žival odstavi od sesanja.

Na začetku študije nihanje v teži uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti. Kadar se subkronična oralna študija izvaja kot predhodnica dolgodobni študiji, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto/pasmo in sev.

Število in spol

Pri glodalcih je treba za vsako velikost odmerka in sočasno kontrolno skupino uporabiti najmanj 40 živali (20 samic in 20 samcev). Samice naj bodo nuliparne in nebreje. Če so načrtovana vmesna žrtvovanja, je treba število povečati za število živali, ki naj bi bile žrtvovane še pred zaključkom študije.

Pri neglodalcih zadostuje tudi manjše število živali, vendar najmanj štiri na spol na skupino.

Velikosti odmerka in pogostost izpostavljenosti

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerka poleg sočasne kontrolne skupine. Najvišja velikost odmerka bi morala sprožiti očitne znake strupenosti, ne da bi povzročila preveliko smrtnost. Najnižja velikost odmerka ne sme povzročiti nikakršnih znakov strupenosti.

Srednje velik odmerek ali odmerke je treba določiti na sredini med visokimi in nizkimi odmerki.

Pri izbiranju velikosti odmerka je treba upoštevati podatke iz predhodnih preskusov in študij strupenosti.

Pogostost izpostavljenosti je običajno dnevna. Če se kemikalija daje v pitni vodi ali vmeša v hrano, mora biti le-ta ves čas na voljo.

Kontrole

Uporabiti je treba sočasno kontrolno skupino, ki je v vseh pogledih identična preskusnim skupinam, razen glede izpostavljenosti preskusni snovi.

V posebnih okoliščinah, kot so inhalacijske študije z aerosoli ali uporaba emulgatorjev v oralnih študijah, katerih biološka aktivnost ni poznana, je treba uporabiti tudi sočasno negativno kontrolno skupino. Negativna kontrolna skupina se obravnava enako kot preskusne skupine, razen da živali niso izpostavljene preskusni snovi ali kateremu koli nosilcu.

Način dajanja

Dva glavna načina dajanja sta oralno in inhalacijsko. Izbira načina dajanja je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti preskusne snovi in verjetnega načina izpostavljenosti pri ljudeh.

Pri uporabi dermalnega načina, se pojavljajo znatne praktične težave. Na kronično sistemsko strupenost, ki je rezultat absorpcije skozi kožo, je mogoče sklepati iz rezultatov kakšnega drugega oralnega preskusa, za ugotovitev obsežnosti absorpcije skozi kožo pa izhajati iz predhodnih preskusov strupenosti pri dajanju skozi kožo.

Oralne študije

Kadar se preskusna snov absorbira iz prebavnega trakta in če je zaužitje eden od možnih načinov izpostavljenosti ljudi, ima, razen v primeru kontraindikacij, prednost oralni način dajanja.

Živali lahko preskusno snov sprejmejo s hrano, raztopljeno v pitni vodi ali v kapsuli.

Najprimerneje je dajati odmerke sedem dni na teden, saj se s petdnevnim dajanjem odmerkov na teden dopušča okrevanje ali odprava strupenosti v času, ko se odmerkov ne daje, to pa bi vplivalo na rezultat ter poznejšo oceno. Vendar pa na podlagi praktičnih ugotovitev velja, da je tudi petdnevno dajanje odmerkov na teden sprejemljivo.

Inhalacijske študije

Ker inhalacijske študije povzročajo bolj zapletene tehnične težave kot drugi načini dajanja, so na tem mestu podane podrobnejše smernice v zvezi s tem načinom dajanja. Upoštevati je treba tudi to, da je lahko v posebnih primerih veljavna alternativa intratrahealna instilacija.

Dolgotrajne izpostavljenosti se običajno zasnovane po vzorcu predvidene izpostavljenosti ljudi, pri čemer se živali izpostavlja ali šest ur na dan po izenačitvi koncentracij v komori, in sicer pet dni na teden (izpostavljenost s prekinitvami), ali, ustrezno možni izpostavljenosti preko okolja, 22 do 24 ur na dan sedem dni na teden (stalna izpostavljenost), pri čemer je približno ena ura na dan približno ob istem času namenjena hranjenju živali in vzdrževanju komore. V obeh primerih so živali običajno izpostavljene nespremenljivim koncentracijam preskusne snovi. Bistvena razlika med izpostavljenostjo s prekinitvami in stalno izpostavljenostjo je v tem, da ima prva 17- do 18-urno obdobje, v katerem lahko živali okrevajo od učinkov vsakodnevne izpostavljenosti, s celo daljšimi obdobji okrevanja med vikendi.

Izbira med izpostavljenostjo s prekinitvami in stalno izpostavljenostjo je odvisna od ciljev študije in izpostavljenosti ljudi, ki na bi se jo simuliralo. Vendar je treba upoštevati tudi nekatere tehnične težave. Na primer, prednosti stalne izpostavljenosti pri simulaciji okoljskih pogojev lahko izniči potreba po napajanju in hranjenju med izpostavljenostjo in potreba po bolj zapletenih (in zanesljivih) tehnikah sproščanja aerosola in hlapov ter tehnikah spremljanja.

Komore za izpostavljanje

Živali je treba preskušati v komorah za inhalacijo, ki so oblikovane tako, da ohranijo dinamičen pretok zraka v količini najmanj 12 sprememb zraka na uro, da se zagotovi ustrezna vsebnost kisika in enakomerno porazdeljeno ozračje izpostavljenosti. Kontrolne komore in komore za izpostavljanje morajo biti po strukturi in obliki identične, da se zagotovijo primerljivi pogoji izpostavljenosti v vseh pogledih, razen glede izpostavljenosti preskusnim snovem. Na splošno se znotraj komore vzdržuje rahel negativen pritisk, da bi se preprečilo uhajanje preskusne snovi v okolico. Natrpanost s preskusnimi živalmi v komorah naj bo minimalna. Na splošno velja, da naj za zagotovitev stabilnosti ozračja v komori skupna količina preskusnih živali ne presega 5 % prostornine preskusne komore.

Meritve ali spremljanje naj zajema:

(i) Pretok zraka: stopnjo pretoka zraka skozi komoro je treba stalno spremljati;

(ii) Koncentracijo: med vsakodnevno izpostavljenostjo, naj preskusna snov ne odstopa za več kot ± 15 % od srednje vrednosti;

(iii) Temperatura in vlažnost: pri glodalcih je treba temperaturo ohranjati na 22 ± 2 °C, vlažnost v komori pa med 30 % in 70 %, razen kadar se uporabi voda za suspendiranje preskusne snovi v ozračju komore. Priporočljivo je oboje stalno spremljati;

(iv) Meritve velikosti delcev: v ozračjih komor s tekočimi ali trdnimi aerosoli je treba določiti porazdelitev velikosti delcev. Delci aerosolov morajo biti take velikosti, da jih uporabljena preskusna žival lahko vdihne. Vzorce ozračij komor je treba vzeti v območju dihanja živali. Vzorec zraka mora predstavljati porazdelitev delcev, katerim so živali izpostavljene, in mora na gravimetrični podlagi predstavljati ves suspendiran aerosol, tudi kadar večina aerosola ni vdihljiva. Analizo velikosti delcev je treba opraviti pogosto v času razvijanja sproščanja koncentracij, da bi se zagotovila stabilnost aerosola, po potrebi pa tudi pozneje med izpostavljenostjo, da bi se ustrezno določila doslednost porazdelitve delcev, ki so jim živali izpostavljene.

Trajanje študije

Obdobje dajanja naj traja najmanj 12 mesecev.

Postopek

Opazovanja

Najmanj enkrat na dan je treba opraviti natančen klinični pregled. Dodatna opazovanja je treba opraviti vsak dan z ustreznimi ukrepi, da se zagotovi minimalna izguba živali med študijo, na primer nekropsija ali zamrznitev mrtvih živali ter izolacija ali žrtvovanje slabotnih ali umirajočih živali. Opraviti je treba natančna opazovanja za ugotovitev nastopa in širjenja vseh strupenih učinkov, ter za zmanjšanje izgube zaradi bolezni, avtolize ali kanibalizma na minimum.

Klinične znake, vključno z nevrološkimi in očesnimi spremembami ter smrtnostjo, je treba zabeležiti za vse živali. Zabeležiti je treba čas nastopa in širjenja strupenih stanj, vključno s sumi na tumorje.

Telesno maso je treba za vsako žival posebej beležiti enkrat na teden v prvih 13. tednih preskusnega obdobja, pozneje pa najmanj enkrat na štiri tedne. Vnos hrane je treba določiti tedensko v prvih 13 tednih študije, potem pa v približno tri mesečnih časovnih presledkih, razen če zdravstveno stanje ali spremembe telesne mase ne zahtevajo drugače.

Hematološka preiskava

Hematološko preiskavo (npr. vsebnost hemoglobina, hematokrit, skupno število eritrocitov, skupno število levkocitov, trombocitov ali druga merjenja zmožnosti koagulacije) je treba opraviti pri treh mesecih, šestih mesecih, potem pa približno v šest mesečnih časovnih presledkih in ob zaključku na vzorcih krvi, odvzetih na vseh neglodalcih in na 10. podganah/spol iz vseh skupin. Če je mogoče, naj bodo krvni vzorci vsakokrat odvzeti na istih podganah. Poleg tega je treba na neglodalcih odvzeti en vzorec še pred preskusom.

Če klinična opažanja kažejo na poslabšanje zdravja živali med študijo, je treba na obolelih živalih opraviti pregled diferencialne krvne slike.

Pregled diferencialne krvne slike se opravi na vzorcih živali iz skupine z najvišjim odmerkom ter kontrolnih skupin. Na naslednji skupini ali skupinah z nizkim odmerkom se pregled diferencialne krvne slike opravi le, kadar gre za večjo neskladnost med skupino z najvišjim odmerkom in kontrolnimi skupinami, ali kadar pride do patoloških ugotovitev.

Analiza urina

Za analizo je treba odvzeti vzorce urina na vseh neglodalcih in na 10. podganah/spol iz vseh skupin, če je mogoče, vsakokrat na istih podganah, tako kot pri hematološki preiskavi. Za vsako posamezno žival ali skupino vzorcev/spol/skupino pri glodalcih je treba določiti naslednje:

— videz: prostornina in gostota pri posameznih živalih,

— proteini, glukoza, ketoni, kri (polkvantitativno določanje),

— mikroskopija sedimenta (polkvantitativno določanje).

Klinična kemija

V približno šest mesečnih časovnih presledkih in ob zaključku se na vseh neglodalcih in na 10. podganah/spol iz vseh skupin, po možnosti vsakokrat na istih podganah, odvzamejo vzorci krvi za meritve na področju klinične kemije. Poleg tega naj se na neglodalcih odvzame en vzorec še pred preskusom. Iz navedenih vzorcev se pripravi plazma in se določi naslednje:

— skupna koncentracija proteinov,

— koncentracija albumina,

— preskus delovanja jeter (kot je aktivnost alkalne fosfataze, aktivnost glutamične piruvične transaminaze ([1]) in aktivnost glutamične oksaloacetat transaminaze ([2])), gama-glutamil-transpeptidaza, ornitin-dekarboksilaza,

— presnova ogljikovih hidratov, kot je krvna glukoza na tešče,

— preskusi delovanja ledvic, kot je sečnina v krvi.

Makroskopska nekropsija

Temeljito makroskopsko nekropsijo je treba opraviti na vseh živalih, vključno s tistimi, ki so umrle med preskusom ali so bile žrtvovane potem, ko se je odkrilo, da so v umirajočem stanju. Pred žrtvovanjem je treba vsem živalim odvzeti vzorce krvi za diferencialno krvno sliko. Vse makroskopsko vidne lezije, tumorje ali lezije, pri katerih gre za sum tumorja, je treba shraniti. Prizadevati si je treba za korelacijo makroskopskih opazovanj z mikroskopskimi ugotovitvami.

Vse organe in tkiva je treba shraniti za histopatološke preiskave. To ponavadi vključuje naslednje organe in tkiva: možgane ([3]) (podaljšano hrbtenjačo/most, skorjo malih možganov in možgansko skorj), hipofizo, ščitnico (vključno z obščitnicami), priželjc, pljuča (vključno s sapnikom), srce, aoro, žleze slinavke, jetra ([3]), vranico, ledvice ([3]), nadledvične žleze ([3]), požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danko, maternico, sečni mehur, limfne vozle, trebušno slinavko, spolne žleze ([3]), pomožne spolne organe, mlečno žlezo samic, kožo, mišičevje, periferni živec, hrbtenjača (vratni, prsni in ledveni del), prsnica s kostnim mozgom ter stegnenica (vključno s sklepom) in oči. Vpihovanje pljuč in sečnega mehurja s fiksativom je najboljši način za ohranitev teh tkiv; vpihovanje pljuč pri inhalacijskih študijah je nujno za ustrezno histopatološko preiskavo. V posebnih študijah, kot so inhalacijske študije, je treba proučiti celotna dihala, vključno z nosom, žrelom in grlom.

Če so opravljeni drugi klinični pregledi, morajo biti podatki, pridobljeni v teh postopkih, na voljo pred mikroskopskim pregledom, saj lahko to daje patologu pomembne smernice.

Histopatologija

Vse vidne spremembe, zlasti tumorje in druge lezije, ki nastanejo na katerem koli organu, je treba mikroskopsko pregledati. Poleg tega so priporočeni še naslednji postopki:

(a) Mikroskopski pregled vseh ohranjenih organov in tkiv s popolnim opisom vseh lezij, odkritih pri:

1. vseh živalih, ki so umrle ali bile žrtvovane med študijo;

2. vseh skupinah z visokimi odmerki in kontrolnih skupinah;

(b) Organi ali tkiva, ki kažejo abnormalnosti, ki je povzročila ali verjetno povzročila preskusna snov se pregledajo tudi pri skupini z nizkim odmerkom

(c) Kadar rezultat preskusa kaže na znatno zmanjšanje normalne življenjske dobe živali ali na sprožitev učinkov, ki lahko vplivajo na odziv strupenosti, je treba pregledati naslednjo skupino z nizkim odmerkom, kot je opisano zgoraj;

(d) Podatki o pojavu lezij, ki so običajne pri sevu uporabljenih živali pod enakimi laboratorijskimi pogoji, npr. pretekli kontrolni podatki, so nepogrešljivi za pravilno oceno pomembnosti sprememb, opaženih na tretiranih živalih.

([1]) Danes poznana kot serumska alanin aminotransferaza.
([2]) Danes poznana kot serumska aspartat aminotransferaza.
([3]) Navedene organe, odvzete na desetih živalih po spolu na skupino v primeru glodalcev ter na vseh neglodalcih, skupaj s ščitnico (in obščitnicami), je treba stehtati.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, pri katerih so opažene lezije, in odstotek živali, ki kažejo določen tip lezije. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,

— preskusni pogoji:

Opis opreme za izpostavljenost:

vključno z obliko, tipom, dimenzijami, virom zraka, sistemom za sproščanje delcev in aerosolov, metodo klimatiziranja, obdelavo izpušnega zraka in metodo nastanitve živali v preskusne komore, kadar so te uporabljene. Opisati je treba opremo za merjenje temperature, vlažnosti in, kadar je ustrezno, stabilnosti koncentracij aerosola ali velikosti delcev.

Podatki o izpostavljenosti:

zbrati jih je treba v tabeli in prikazati s srednjimi vrednostmi ter meritvami nihanj (npr. standardno odstopanje), zajemati pa morajo:

(a) stopnje pretoka zraka skozi naprave za inhalacijo;

(b) temperaturo in vlažnost zraka;

(c) nominalne koncentracije (skupna količina preskusne snovi, dane v naprave za inhalacijo deljeno s prostornino zraka);

(d) vrsto nosilca, če je ta uporabljen;

(e) dejanske koncentracije na preskuševalnem dihalnem območju;

(f) mediano velikosti delcev (kjer je to primerno),

— velikosti odmerkov (vključno z nosilcem, če je uporabljen) in koncentracije,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in koncentraciji,

— velikost odmerka, pri kateri ni opaženega učinka,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,

— opis strupenih ali drugih učinkov,

— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o hrani in telesni masi,

— oftalmološke ugotovitve,

— opravljeni hematološki preskusi in vsi rezultati,

— opravljeni klinično biokemijski preskusi in vsi rezultati (vključno z rezultati vsake analize urina),

— ugotovitve nekropsije,

— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov, kadar je to ustrezno,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS RAKOTVORNOSTI

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se običajno daje sedem dni na teden na ustrezen način nekaj skupinam preskusnih živali, in sicer po en odmerek na skupino večji del življenjske dobe živali. Med in po izpostavljenosti preskusni snovi se živali opazujejo dnevno, da bi se odkrilo znake strupenosti, zlasti razvoj tumorjev.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine.

Preskusne živali

Na podlagi rezultatov predhodno opravljenih študij je mogoče uporabiti tudi druge vrste (glodalce ali neglodalce). Uporabiti je treba splošno uporabljene laboratorijske seve mladih zdravih živali, dajanje odmerkov pa naj se začne čim prej, potem ko se žival odstavi od sesanja.

Na začetku študije nihanje v teži uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti. Kadar se subkronična oralna študija izvaja kot predhodnica dolgodobni študiji, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto/pasmo in sev.

Število in spol

Pri glodalcih je treba za vsako velikost odmerka in sočasno kontrolno skupino uporabiti najmanj 100 živali (50 samic in 50 samcev). Samice naj bodo nuliparne in nebreje. Če so načrtovana vmesna žrtvovanja, je treba število povečati za število živali, ki naj bi bile žrtvovane še pred zaključkom študije.

Velikosti odmerkov in pogostost izpostavljenosti

Uporabiti je treba najmanj tri velikosti odmerkov poleg sočasne kontrolne skupine. Najvišja velikost odmerka bi morala sprožiti znake minimalne strupenosti, kot je rahel zastoj pri pridobivanju telesne mase (manj kot 10 %), ne da bi se pri tem bistveno spremenila normalna življenjska doba zaradi drugih učinkov, razen tumorjev.

Najnižja velikost odmerka ne sme vplivati na normalno rast, razvoj in življenjsko dobo živali ali povzročiti kakršne koli znake strupenosti. Na splošno ta ne sme biti nižja od 10 % visokega odmerka.

Srednje velik odmerek ali odmerke je treba določiti na sredini med visokimi in nizkimi odmerki.

Pri izbiranju velikosti odmerka je treba upoštevati podatke iz predhodnih preskusov in študij strupenosti.

Pogostost izpostavljenosti je običajno dnevna. Če se kemikalija daje v pitni vodi ali vmeša v hrano, mora biti ta ves čas na voljo.

Kontrole

Uporabiti je treba sočasno kontrolno skupino, ki je v vseh ozirih identična preskusnim skupinam, razen glede izpostavljenosti preskusni snovi.

V posebnih okoliščinah, kot so inhalacijske študije z aerosoli ali uporaba emulgatorjev v oralnih študijah, katerih biološka aktivnost ni znana, je treba uporabiti dodatno kontrolno skupino, ki ni izpostavljena nosilcu.

Način dajanja

Trije glavni načini dajanja so oralni, dermalni in inhalacijski. Izbira načina dajanja je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti preskusne snovi in verjetnega načina izpostavljenosti pri ljudeh.

Oralne študije

Kadar se preskusna snov absorbira iz prebavnega trakta in če je zaužitje eden od možnih načinov izpostavljenosti ljudi, ima, razen v primeru kontraindikacij, prednost oralni način dajanja. Živali lahko preskusno snov sprejmejo s hrano, raztopljeno v pitni vodi ali v kapsuli.

Najprimerneje je dajati odmerke sedem dni na teden, saj se s petdnevnim dajanjem odmerkov na teden dopušča okrevanje ali odprava strupenosti v času, ko se odmerkov ne daje, to pa bi vplivalo na rezultat ter poznejšo oceno. Vendar pa na podlagi praktičnih ugotovitev velja, da je tudi petdnevno dajanje odmerkov na teden sprejemljivo.

Dermalne študije

Odločiti se je mogoče za izpostavljenost z barvanjem kože, s čimer se simulira glavni način izpostavljenosti človeka, kar služi kot modelni sistem za povzročitev kožnih lezij.

Inhalacijske študije

Ker inhalacijske študije povzročajo kompleksnejše tehnične težave kot drugi načini dajanja, so na tem mestu podane podrobnejše smernice v zvezi s tem načinom dajanja. Upoštevati je treba tudi to, da je lahko v posebnih primerih veljavna alternativa intratrahealna instilacija.

Dolgotrajne izpostavljenosti so običajno zasnovane po vzorcu predvidene izpostavljenosti ljudi, pri čemer se živali izpostavlja ali šest ur na dan po izenačitvi koncentracij v komori, in sicer pet dni na teden (izpostavljenost s prekinitvami), ali, ustrezno možni izpostavljenosti preko okolja, 22 do 24 ur na dan sedem dni na teden (stalna izpostavljenost), pri čemer je približno ena ura na dan približno ob istem času namenjena hranjenju živali in vzdrževanju komor. V obeh primerih so živali običajno izpostavljene nespremenljivim koncentracijam preskusne snovi.

Velika razlika med izpostavljenostjo s prekinitvami in stalno izpostavljenostjo je v tem, da ima prva 17- do 18-urno obdobje, v katerem lahko živali okrevajo od učinkov vsakodnevne izpostavljenosti, s celo daljšimi obdobji okrevanja med vikendi.

Izbira med izpostavljenostjo s prekinitvami in stalno izpostavljenostjo je odvisna od ciljev študije in izpostavljenosti ljudi, ki na bi se jo simuliralo. Vendar je treba upoštevati tudi nekatere tehnične težave. Na primer prednosti stalne izpostavljenosti pri simulaciji okoljskih pogojev lahko izniči potreba po napajanju in hranjenju med izpostavljenostjo in potreba po bolj zapletenih (in zanesljivih) tehnikah sproščanja aerosola in hlapov ter tehnikah spremljanja.

Komore za izpostavljanje

Živali je treba preskušati v komorah za inhalacijo, ki so oblikovane tako, da ohranijo dinamičen pretok zraka v količini najmanj 12 sprememb zraka na uro, s čimer se zagotovi ustrezna vsebnost kisika in enakomerno porazdeljeno ozračje izpostavljenosti. Kontrolne komore in komore za izpostavljanje morajo biti po strukturi in obliki identične, da se zagotovijo primerljivi pogoji izpostavljenosti, v vseh ozirih, razen glede izpostavljenosti preskusnim snovem. Na splošno se znotraj komore vzdržuje rahel negativen pritisk, da bi se preprečilo uhajanje preskusne snovi v okolico. Natrpanost s preskusnimi živalmi v komorah naj bo minimalna. Na splošno velja, da naj za zagotovitev stabilnosti ozračja v komori skupna količina preskusnih živali ne presega 5 % prostornine preskusne komore.

Meritve ali spremljanje naj zajema:

(i) Pretok zraka: stopnjo pretoka zraka skozi komoro je treba stalno spremljati;

(ii) Koncentracijo: med vsakodnevno izpostavljenostjo, naj preskusna snov ne odstopa za več kot ± 15 % od srednje vrednosti. Med celotno študijo naj bodo vsakodnevne koncentracije kolikor je mogoče nespremenljive.

(iii) Temperatura in vlažnost: pri glodalcih je treba temperaturo ohranjati na 22 ± 2 °C, vlažnost v komori pa med 30 % in 70 %, razen kadar se uporabi voda za suspendiranje preskusne snovi v ozračju komore. Najprimerneje je oboje stalno spremljati;

(iv) Meritve velikosti delcev: v ozračjih komor s tekočimi ali trdnimi aerosoli je treba določiti porazdelitev velikosti delcev. Delci aerosolov morajo biti take velikosti, da jih uporabljena preskusna žival lahko vdihne. Vzorce ozračij komor je treba vzeti v območju dihanja živali. Vzorec zraka mora predstavljati porazdelitev delcev, katerim so živali izpostavljene, in mora na gravimetrični podlagi predstavljati ves suspendiran aerosol, tudi kadar večina aerosola ni vdihljiva. Analizo velikosti delcev je treba opraviti pogosto v času razvijanja sproščanja koncentracij, da bi se zagotovila stabilnost aerosola, po potrebi pa tudi pozneje med izpostavljenostjo, da bi se ustrezno določila doslednost porazdelitve delcev, ki so jim živali izpostavljene.

Trajanje študije

Trajanje preskusa rakotvornosti zajema večji del normalne življenjske dobe živali. Preskus na miših in hrčkih naj se zaključi pri 18. mesecih, na podganah pa pri 24. mesecih; v primeru nekaterih živalskih sevov z daljšo življenjsko dobo in/ali nižjo spontano stopnjo tumorjev, pa naj se preskus na miših in hrčkih zaključi pri 24. mesecih, na podganah pa pri 30. mesecih. Sprejemljivo je tudi, da se tako podaljšana študija zaključi, ko število preživelih živali v skupini z najnižjim odmerkom ali v kontrolni skupini doseže 25 %. Kadar se zaključi preskus, v katerem gre za očitno razliko v odzivu glede na spol, je treba vsak spol obravnavati posebej. Kadar zaradi očitnih znakov strupenosti pride do prezgodnje smrti samo v skupini z visokim odmerkom, to ne pomeni, da je treba preskus zaključiti, če pojav strupenosti v drugih skupinah ne povzroča težav. Da bi bil negativen rezultat sprejemljiv, v nobeni skupini ne sme priti do več kot 10 % izgube živali zaradi avtolize, kanibalizma ali težav z izvajanjem, in preživetje v vseh skupinah v 18. mesecu pri miših in hrčkih ter v 24. mesecu pri podganah ne sme biti manjše od 50 %.

Postopek

Opazovanja

Vsakodnevno opazovanje v kletkah naj vključuje spremembe na koži in krznu, v očeh in sluznicah, ter v dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu.

Redno opazovanje živali je potrebno za zagotovitev, da če je le mogoče med preskusom ne pride do izgube živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napačne postavitve. Kadar se opazi umirajoče živali, jih je treba odstraniti in opraviti nekropsijo.

Za vse živali je treba zabeležiti klinične znake in smrtnost. Posebno pozornost je treba posvetiti razvoju tumorjev: zabeležiti je treba čas nastopa, mesto, velikosti, videz in napredovanje vseh makroskopsko vidnih ali otipljivih tumorjev.

Porabo hrane (in porabo vode, kadar se preskusna snov daje s pitno vodo) je treba v prvih 13 tednih študije meriti tedensko, potem pa približno v tri mesečnih časovnih presledkih, razen če spremembe zdravstvenega stanja ali telesne mase ne zahtevajo drugače.

Telesno maso vsake posamezne živali je treba v prvih 13. mesecih preskusnega obdobja zabeležiti enkrat tedensko, potem pa še najmanj enkrat na štiri tedne.

Klinični pregledi

Hematologija

Če opazovanja v kletkah kažejo na poslabšanje zdravja živali med študijo, je treba na obolelih živalih opraviti pregled diferencialne krvne slike.

V 12. mesecu, 18. mesecu in tik pred žrtvovanjem se živalim odvzame vzorec krvi. Pregled diferencialne krvne slike se opravi na vzorcih živali iz skupine z najvišjim odmerkom ter kontrolnih skupin. Če se na podlagi teh podatkov, zlasti tistih, pridobljenih tik pred žrtvovanjem, ali podatkov, dobljenih po patološkem pregledu, pokaže potreba, je treba opraviti pregled diferencialne krvne slike tudi na naslednji skupini ali skupinah z nižjim odmerkom.

Makroskopska nekropsija

Popolno makroskopsko nekropsijo je treba opraviti na vseh živalih, vključno s tistimi, ki so umrle med preskusom ali so bile žrtvovane potem, ko se je odkrilo, da so v umirajočem stanju. Vse velike vidne lezije, tumorje ali lezije, pri katerih gre za sum tumorja, je treba shraniti.

Naslednje organe in tkiva je treba shraniti v ustreznem mediju za morebitne poznejše histopatološke preiskave: možgane (vključno z deli podaljšane hrbtenjače/mosta, skorjo malih možganov in možgansko skorjo), hipofizo, ščitnico/obščitnico in tkiva priželjca, sapnik in pljuča, srce, aorto, žleze slinavke, jetra, vranico, ledvice, nadledvične žleze, trebušno slinavko, spolne žleze, maternico, pomožne spolne organe, kožo, požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danko, sečni mehur, reprezentativni limfni vozel, mlečno žlezo samice, stegensko mišičevje, periferni živec, prsnica s kostnim mozgom, stegnenico (vključno s sklepom), hrbtenjačo na treh ravneh (vrtni, prsni in ledveni) in oči.

Vpihovanje pljuč in sečnega mehurja s fiksativom je najboljši način za ohranitev teh tkiv; vpihovanje pljuč pri inhalacijskih študijah je nujno za ustrezno histopatološko preiskavo. V posebnih študijah, kot so inhalacijske študije, je treba ohraniti celotna dihala, vključno z nosno votlino, žrelom in grlom.

Histopatologija

(a) Temeljito histopatološko preiskavo je treba opraviti na organih in tkivih vseh živali, ki so umrle ali bile žrtvovane med preskusom in na živalih iz kontrolne skupine in skupine z visokim odmerkom.

(b) V vseh skupinah je treba mikroskopsko pregledati vse velike vidne tumorje ali lezije, pri katerih se sumi na tumor.

(c) Če gre za bistveno razliko pri pojavu neoplastičnih lezij v skupini z visokim odmerkom in kontrolni skupini, je treba opraviti histopatološko preiskavo na teh organih tudi v drugih skupinah.

(d) Če je preživelih živali v skupini z visokim odmerkom bistveno manj kot v kontrolni skupini, je treba v celoti pregledati naslednjo skupino z nižjim odmerkom.

(e) Če v skupini z visokim odmerkom obstajajo znaki o povzročitvi strupenih ali drugih učinkov, ki bi lahko vplivali na neoplastični odgovor, je treba v celoti pregledati naslednjo skupino z nižjim odmerkom.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, pri katerih so opaženi tumorji, odkriti med preskusom, čas odkritja in število živali, na katerih so bili tumorji odkriti po žrtvovanju. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,

— preskusni pogoji:

Opis opreme za izpostavljenost:

vključno z obliko, tipom, dimenzijami, virom zraka, sistemom za sproščanje delcev in aerosolov, metodo klimatiziranja, obdelavo izpušnega zraka in metodo nastanitve živali v preskusne komore, kadar so te uporabljene. Opisati je treba opremo za merjenje temperature, vlažnosti in, kadar je ustrezno, stabilnosti koncentracij aerosola ali velikosti delcev.

Podatki o izpostavljenosti:

zbrati jih je treba v tabeli in prikazati s srednjimi vrednostmi ter meritvami nihanj (npr. standardno odstopanje), zajemati pa morajo:

(a) stopnje pretoka zraka skozi naprave za inhalacijo;

(b) temperaturo in vlažnost zraka;

(c) nominalne koncentracije (skupna količina preskusne snovi, dane v naprave za inhalacijo deljeno z prostornino zraka);

(d) vrsto nosilca, če je ta uporabljen;

(e) dejanske koncentracije na preskusnem dihalnem območju;

(f) mediano velikosti delcev (kjer je to primerno),

— velikosti odmerkov (vključno z nosilcem, če je uporabljen) in koncentracije,

— pojavnost tumorjev po spolu, odmerku in tipu tumorja,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in koncentraciji,

— opis strupenih ali drugih učinkov,

— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o hrani in telesni masi,

— opravljeni hematološki preskusi in vsi rezultati,

— ugotovitve nekropsije,

— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov z opisom uporabljene metode,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

KOMBINIRAN PRESKUS KRONIČNE STRUPENOSTI/RAKOTVORNOSTI

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Cilj kombiniranega preskusa strupenosti/rakotvornosti je opredeliti kronične in rakotvorne učinke snovi na vrstah sesalcev po dolgotrajni izpostavljenosti.

Zaradi tega se preskusu rakotvornosti doda najmanj ena preskusna satelitska skupina in kontrolna satelitska skupina. Odmerek v satelitski skupini z visokim odmerkom je lahko večji od odmerka za skupino z visokim odmerkom v preskusu rakotvornosti. Živali v preskusu rakotvornosti se pregledajo za splošno strupenost, ter za rakotvorni odziv. Živali iz preskusne satelitske skupine se pregledajo za splošno strupenost.

Preskusna snov se običajno daje sedem dni na teden na ustrezen način nekaj skupinam preskusnih živali, in sicer po en odmerek na skupino, večji del življenjske dobe živali. Med in po izpostavljenosti preskusni snovi se živali opazujejo dnevno, da bi se odkrilo znake strupenosti, zlasti razvoj tumorjev.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine.

Preskusne živali

Priporočena vrsta je podgana. Na podlagi rezultatov predhodno opravljenih študij je mogoče uporabiti tudi druge vrste (glodalce ali neglodalce). Uporabiti je treba splošno uporabljene laboratorijske seve mladih zdravih živali, dajanje odmerkov pa naj se začne čim prej, potem ko se žival odstavi od sesanja.

Na začetku preskusa nihanje v teži uporabljenih živali ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti. Kadar se subkronična oralna študija izvaja kot predhodnica dolgodobni študiji, je treba v obeh študijah uporabiti isto vrsto in pasmo/sev.

Število in spol

Pri glodalcih je treba za vsako velikost odmerka in sočasno kontrolno skupino uporabiti najmanj 100 živali (50 samic in 50 samcev). Samice naj bodo nuliparne in nebreje. Če so načrtovana vmesna žrtvovanja, je treba število povečati za število živali, ki naj bi bile žrtvovane še pred zaključkom študije.

Preskusna satelitska skupina ali skupine za oceno drugih bolezni, razen tumorjev, naj vsebuje po 20 živali vsakega spola, medtem ko naj satelitska kontrolna skupina vsebuje po 10 živali vsakega spola.

Velikost odmerka in pogostost izpostavljenosti

Za namene preskusa rakotvornosti je treba uporabiti najmanj tri velikosti odmerka poleg sočasne kontrolne skupine. Najvišja velikost odmerka bi morala sprožiti znake minimalne strupenosti, kot je rahel zastoj pri pridobivanju telesne mase (manj kot 10 %), ne da bi se pri tem bistveno spremenila normalna življenjska doba zaradi drugih učinkov, razen tumorjev.

Najnižja velikost odmerka ne sme vplivati na normalno rast, razvoj in življenjsko dobo živali ali povzročiti kakršne koli znake strupenosti. Na splošno ta ne sme biti nižja od 10 % visokega odmerka.

Srednje velik odmerek ali odmerke je treba določiti na sredini med visokimi in nizkimi odmerki.

Pri izbiranju velikosti odmerka je treba upoštevati podatke iz predhodnih preskusov in študij strupenosti.

Za namene preskusa kronične strupenosti se v preskus vključijo dodatne preskusne skupine in sočasna kontrolna satelitska skupina. Visok odmerek mora na živalih iz preskusne satelitske skupine povzročiti jasne znake strupenosti.

Pogostost izpostavljenosti je običajno dnevna. Če se kemikalija daje v pitni vodi ali vmeša v hrano, mora biti ta ves čas na voljo.

Kontrole

Uporabiti je treba sočasno kontrolno skupino, ki je v vseh ozirih identična preskusnim skupinam, razen glede izpostavljenosti preskusni snovi.

V posebnih okoliščinah, kot so inhalacijske študije z aerosoli ali uporaba emulgatorjev v oralnih študijah, katerih biološka aktivnost ni znana, je treba uporabiti dodatno kontrolno skupino, ki ni izpostavljena nosilcu.

Način dajanja

Trije glavni načini dajanja so oralni, dermalni in inhalacijski. Izbira načina dajanja je odvisna od fizikalnih in kemijskih lastnosti preskusne snovi in verjetnega načina izpostavljenosti ljudi.

Oralni preskusi

Kadar se preskusna snov absorbira iz prebavnega trakta in če je zaužitje eden od načinov izpostavljenosti ljudi, ima prednost oralni način dajanja, razen v primeru kontraindikacij. Živali lahko preskusno snov sprejmejo s hrano, raztopljeno v pitni vodi ali v kapsuli. Najprimerneje je dajati odmerke sedem dni na teden, saj se s petdnevnim dajanjem odmerkov na teden dopušča okrevanje ali odprava strupenosti v času, ko se odmerkov ne daje, to pa bi vplivalo na rezultat ter poznejšo oceno. Vendar pa na podlagi praktičnih ugotovitev velja, da je tudi petdnevno dajanje odmerkov na teden sprejemljivo.

Dermalni preskusi

Odločiti se je mogoče za izpostavljenost z barvanjem kože, s čimer se simulira glavni način izpostavljenosti človeka in kar služi kot modelni sistem za povzročitev kožnih lezij.

Inhalacijski preskusi

Ker inhalacijski preskusi povzročajo kompleksnejše tehnične težave kot drugi načini dajanja, so na tem mestu podane podrobnejše smernice v zvezi s tem načinom dajanja. Zapomniti si je treba tudi to, da je lahko v posebnih primerih veljavna alternativa intratrahealna instilacija.

Dolgotrajne izpostavljenosti so običajno zasnovane po vzorcu predvidene izpostavljenosti ljudi, pri čemer se živali izpostavlja ali šest ur na dan po izenačitvi koncentracij v komori, in sicer pet dni na teden (izpostavljenost s prekinitvami), ali, ustrezno možni izpostavljenosti preko okolja, 22 do 24 ur na dan sedem dni na teden (stalna izpostavljenost), pri čemer je približno ena ura na dan približno ob istem času namenjena hranjenju živali in vzdrževanju komor. V obeh primerih so živali običajno izpostavljene nespremenljivim koncentracijam preskusne snovi. Bistvena razlika med izpostavljenostjo s prekinitvami in stalno izpostavljenostjo je v tem, da ima prva 17- do 18-urno obdobje, v katerem lahko živali okrevajo od učinkov vsakodnevne izpostavljenosti, s celo daljšimi obdobji okrevanja med vikendi.

Izbira med izpostavljenostjo s prekinitvami in stalno izpostavljenostjo je odvisna od ciljev preskusa in izpostavljenosti ljudi, ki naj bi se jo simuliralo. Vendar je treba upoštevati tudi nekatere tehnične težave. Na primer, prednosti stalne izpostavljenosti pri simulaciji okoliških pogojev lahko izniči potreba po napajanju in hranjenju med izpostavljenostjo in potreba po bolj zapletenih (in zanesljivih) tehnikah sproščanja aerosola in hlapov ter tehnikah spremljanja.

Komore za izpostavljanje

Živali je treba preskušati v komorah za inhalacijo, ki so oblikovane tako, da ohranijo dinamičen pretok zraka v količini najmanj 12 sprememb zraka na uro, s čimer se zagotovi ustrezna vsebnost kisika in enakomerno porazdeljeno ozračje izpostavljenosti. Kontrolne komore in komore za izpostavljanje morajo biti po strukturi in obliki identične, da se zagotovijo primerljivi pogoji izpostavljenosti, v vseh ozirih, razen glede izpostavljenosti preskusnim snovem. Na splošno se znotraj komore vzdržuje rahel negativen pritisk, da bi se preprečilo uhajanje preskusne snovi v okolico. Natrpanost s preskusnimi živalmi v komorah naj bo minimalna. Na splošno velja, da naj za zagotovitev stabilnosti ozračja v komori skupna količina preskusnih živali ne presega 5 % prostornine preskusne komore.

Meritve ali spremljanje naj zajema:

(i) Pretok zraka: stopnjo pretoka zraka skozi komoro je treba stalno spremljati;

(ii) Koncentracijo: med vsakodnevno izpostavljenostjo, naj preskusna snov ne odstopa za več kot ± 15 % od srednje vrednosti. Med celotno študijo naj bodo vsakodnevne koncentracije kolikor je mogoče nespremenljive.

(iii) Temperatura in vlažnost: pri glodalcih je treba temperaturo ohranjati na 22 ± 2 °C, vlažnost v komori pa med 30 % in 70 %, razen kadar se uporabi voda za suspendiranje preskusne snovi v ozračju komore. Najprimerneje je oboje stalno spremljati;

(iv) Meritve velikosti delcev: v ozračjih komor s tekočimi ali trdnimi aerosoli je treba določiti porazdelitev velikosti delcev. Delci aerosolov morajo biti take velikosti, da jih uporabljena preskusna žival lahko vdihne. Vzorce ozračij komor je treba vzeti v območju dihanja živali. Vzorec zraka mora predstavljati porazdelitev delcev, katerim so izpostavljene živali, in mora na gravimetrični podlagi predstavljati ves suspendiran aerosol, tudi kadar večina aerosola ni vdihljiva. Analizo velikosti delcev je treba opraviti pogosto v času razvijanja sproščanja koncentracij, da bi se zagotovila stabilnost aerosola, po potrebi pa tudi pozneje med izpostavljenostjo, da bi se ustrezno določila doslednost porazdelitve delcev, ki so jim živali izpostavljene.

Trajanje študije

Trajanje dela preskusa, ki se tiče rakotvornosti, zajema večji del normalne življenjske dobe živali. Preskus naj se na miših in hrčkih zaključi pri 18. mesecih, na podganah pa pri 24. mesecih; kljub temu pa naj se v primeru nekaterih živalskih sevov z daljšo življenjsko dobo in/ali nižjo spontano stopnjo tumorjev, preskus na miših in hrčkih zaključi pri 24. mesecih, na podganah pa pri 30. mesecih. Sprejemljivo pa je tudi, da se tako podaljšana študija zaključi, ko število preživelih živali v skupini z najnižjim odmerkom ali v kontrolni skupini doseže 25 %. Kadar se zaključi preskus, v katerem gre za očitno razliko v odzivu glede na spol, je treba vsak spol obravnavati posebej. Kadar zaradi očitnih znakov strupenosti pride do prezgodnje smrti samo v skupini z visokim odmerkom, to ne pomeni, da je treba preskus zaključiti, če pojav strupenosti v drugih skupinah ne povzroča težav. Da bi bil negativen rezultat sprejemljiv, v nobeni skupini ne sme priti do več kot 10 % izgube živali zaradi avtolize, kanibalizma ali težav z izvajanjem, preživetje v 18. mesecu pri miših in hrčkih ter v 24. mesecu pri podganah pa ne sme biti v nobeni skupini manjše od 50 %.

Satelitske skupine 20 tretiranih živali vsakega spola ter 10 živali vsakega spola iz spremljajoče kontrolne skupine, uporabljene za preskus kronične strupenosti je treba ohraniti v preskusu najmanj 12 mesecev. Te živali je treba nameniti za žrtvovanje za pregled s preskusno snovjo povezane patologije, na katero ne vplivajo gerontološke spremembe.

Postopek

Opazovanja

Opraviti je treba vsakodnevna opazovanja v kletkah, ki naj vključujejo spremembe na koži in krznu, v očeh in sluznicah, ter v dihalnem in krvožilnem sistemu, avtonomnem in osrednjem živčnem sistemu, somatomotorični aktivnosti ter vedenjskem vzorcu.

Klinične preglede na živalih v tretirani satelitski skupini ali skupinah je treba opraviti v ustreznih časovnih presledkih.

Redno opazovanje živali je potrebno za zagotovitev, da med preskusom ne pride do izgube živali zaradi kanibalizma, avtolize tkiv ali napačne postavitve. Ko se opazi umirajoče živali, jih je treba odstraniti in opraviti nekropsijo.

Klinične znake vključno z nevrološkimi in očesnimi spremembami, ter smrtnostjo je treba zabeležiti pri vseh živalih. Posebno pozornost je treba nameniti razvoju tumorjev: zabeležiti je treba čas nastopa, mesto, velikosti, videz in napredovanje vseh makroskopsko vidnih ali otipljivih tumorjev; zabeležiti je treba tudi čas nastopa in napredovanje strupenih stanj.

Porabo hrane (in porabo vode, kadar se preskusna snov daje s pitno vodo) je treba v prvih 13 tednih študije meriti tedensko, potem pa približno v tri mesečnih časovnih presledkih, razen če spremembe zdravstvenega stanja ali telesne mase ne zahtevajo drugače.

Telesno maso vsake posamezne živali je treba enkrat v prvih 13. mesecih preskusnega obdobja zabeležiti tedensko, potem pa najmanj enkrat na štiri tedne.

Klinični pregledi

Hematologija

Hematološka preiskava (npr. vsebnost hemoglobina, hematokrit, skupno število eritrocitov, skupno število levkocitov, trombocitov ali druga merjenja zmožnosti koagulacije) je treba opraviti pri treh mesecih, šestih mesecih, potem pa približno v šest mesečnih časovnih presledkih in ob zaključku na vzorcih krvi, odvzetih pri 10. podganah/spol iz vseh skupin. Če je mogoče, naj bodo krvni vzorci vsakokrat odvzeti istim podganam.

Če klinična opažanja kažejo na poslabšanje zdravja živali med študijo, je treba na obolelih živalih opraviti pregled diferencialne krvne slike.

Pregled diferencialne krvne slike se opravi na vzorcih živali iz skupine z najvišjim odmerkom ter kontrolah. Na naslednji skupini ali skupinah z nizkim odmerkom se pregled diferencialne krvne slike opravi le, kadar gre za večjo neskladnost med skupino z najvišjim odmerkom in kontrolnimi skupinami, ali kadar pride do patoloških ugotovitev.

Analiza urina

Za analizo je treba odvzeti vzorce urina pri 10. podganah/spol iz vseh skupin, če je mogoče, vsakokrat istim podganam, tako kot pri hematološki preiskavi. Za vsako posamezno žival ali skupino vzorcev/spol/skupino pri glodalcih je treba določiti naslednje:

— videz: prostornina in gostota pri posamezni živali,

— proteini, glukoza, ketoni, kri (polkvantitativno določanje),

— mikroskopija sedimenta (polkvantitativno določanje).

Klinična kemija

V približno šest mesečnih časovnih presledkih in ob zaključku se pri vseh neglodalcih in pri 10. podganah/-spol iz vseh skupin, po možnosti vsakokrat istim podganam, odvzamejo vzorci krvi za meritve na področju klinične kemije. Poleg tega naj se na neglodalcih odvzame en vzorec še pred preskusom. Iz navedenih vzorcev se pripravi plazma in se določi naslednje:

— skupna koncentracija proteinov,

— koncentracija albumina,

— preskus delovanja jeter (kot je aktivnost alkalne fosfataze, aktivnost glutamične piruvične transaminaze ([1]) in aktivnost glutamične oksaloacetat transaminaze ([2])), gama-glutamil-transpeptidaza, ornitin-dekarboksilaza,

— presnova ogljikovih hidratov, kot je krvna glukoza na tešče,

— preskusi delovanja ledvic, kot je sečnina v krvi.

([1]) Danes poznana kot serumska alanin aminotransferaza.
([2]) Danes poznana kot serumska aspartat aminotransferaza.

Makroskopska nekropsija

Popolno makroskopsko nekropsijo je treba opraviti na vseh živalih, vključno s tistimi, ki so umrle med preskusom ali so bile žrtvovane potem, ko se je odkrilo, da so v umirajočem stanju. Pred žrtvovanjem je treba vsem živalim odvzeti vzorce krvi za diferencialno krvno sliko. Vse velike vidne tumorje ali lezije, pri katerih gre za sum tumorja, je treba shraniti. Prizadevati si je treba za korelacijo makroskopskih opazovanj z mikroskopskimi ugotovitvami.

Vse organe in tkiva je treba shraniti za histopatološke preiskave. To po navadi zadeva naslednje organe in tkiva: možgane ([1]) (podaljšano hrbtenjačo/most, skorjo malih možganov in možgansko skorja), hipofizo, ščitnico (vključno z obščitnicami), priželjc, pljuča (vključno s sapnikom), srce, aorto, žleze slinavke, jetra ([1]), vranico, ledvice ([1]), nadledvične žleze ([1]), požiralnik, želodec, dvanajsternik, zgornje tanko črevo, spodnje tanko črevo, slepo črevo, debelo črevo, danko, maternico, sečni mehur, limfne vozle, trebušno slinavko, spolne žleze ([1]), pomožne spolne organe, mlečno žlezo samic, kožo, mišičevje, periferni živec, hrbtenjačo (vratni, prsni in ledveni del), prsnico s kostnim mozgom, stegnenico (vključno s sklepom) in oči.

Čeprav je vpihovanje pljuč in sečnega mehurja s fiksativom najboljši način za ohranitev teh tkiv, je vpihovanje pljuč v inhalacijskih študijah nujno zahtevano za ustrezno histopatološko preiskavo. V posebnih študijah, kot so inhalacijske študije, je treba proučiti celotna dihala, vključno z nosom, žrelom in grlom.

Če so opravljeni drugi klinični pregledi, morajo biti podatki, pridobljeni v teh postopkih, na voljo pred mikroskopskim pregledom, saj lahko to daje patologu pomembne smernice.

Histopatologija

Za del, ki obsega preskus kronične strupenosti:

Opraviti je treba podroben pregled vseh ohranjenih organov vseh živali v satelitski skupini z visokim odmerkom in kontrolni skupini. Kadar se v satelitski skupini z visokim odmerkom odkrije s preskusno snovjo povezana patologija, je treba ob zaključku študije podrobni histopatološki preiskavi izpostaviti še ciljne organe vseh drugih živali iz vseh ostalih preskusnih satelitskih skupin, kot tudi tiste iz preskusnih skupin dela študije, ki obsega preskus rakotvornosti.

Za del, ki obsega preskus rakotvornosti:

(a) Temeljito histopatološko preiskavo je treba opraviti na organih in tkivih vseh živali, ki so umrle ali bile žrtvovane med preskusom in na živalih iz kontrolne skupine in skupine z visokim odmerkom.

(b) V vseh skupinah je treba mikroskopsko pregledati vse makroskopsko vidne tumorje ali lezije, pri katerih se sumi na tumor.

(c) Če gre za bistveno razliko pri pojavu neoplastičnih lezij v skupini z visokim odmerkom in kontrolni skupini, je treba opraviti histopatološko preiskavo na teh organih tudi v drugih skupinah.

(d) Če je preživelih živali v skupini z visokim odmerkom bistveno manj kot v kontrolni skupini, je treba v celoti pregledati naslednjo skupino z nižjim odmerkom.

(e) Če v skupini z visokim odmerkom obstajajo znaki o povzročitvi strupenih ali drugih učinkov, ki bi lahko vplivali na neoplastični odziv, je treba v celoti pregledati naslednjo skupino z nižjim odmerkom.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število živali, pri katerih so opaženi tumorji ali strupeni učinki, odkriti med preskusom, čas odkritja in število živali, na katerih so bili tumorji odkriti po žrtvovanju. Rezultate je treba oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,

([1]) Navedene organe, odvzete na 10 živalih po spolu na skupino, je treba stehtati.

— preskusni pogoji:

Opis opreme za izpostavljenost:

vključno z obliko, tipom, dimenzijami, virom zraka, sistemom za sproščanje delcev in aerosolov, metodo klimatiziranja, obdelavo izpušnega zraka in metodo nastanitve živali v preskusne komore, kadar so te uporabljene. Opisati je treba opremo za merjenje temperature, vlažnosti in, kadar je ustrezno, stabilnosti koncentracij aerosola ali velikosti delcev.

Podatki o izpostavljenosti:

zbrati jih je treba v tabeli in prikazati s srednjimi vrednostmi ter meritvami nihanj (npr. standardno odstopanje), zajemati pa morajo:

(a) stopnje pretoka zraka skozi naprave za inhalacijo;

(b) temperaturo in vlažnost zraka;

(c) nominalne koncentracije (skupna količina preskusne snovi, dane v naprave za inhalacijo deljeno s prostornino zraka);

(d) vrsto nosilca, če je ta uporabljen;

(e) dejanske koncentracije v preskusnem dihalnem območju;

(f) mediano velikosti delcev (kjer je to primerno),

— velikosti odmerkov (vključno z nosilcem, če je uporabljen) in koncentracije,

— pojavnost tumorjev po spolu, odmerku in tipu tumorja,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka, vključno s satelitsko skupino,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in koncentraciji,

— opis strupenih ali drugih učinkov,

— čas opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— oftalmološke ugotovitve,

— podatki o hrani in telesni masi,

— opravljeni hematološki preskusi in vsi rezultati,

— opravljeni klinično biokemijski preskusi in vsi rezultati (vključno z rezultati vsake analize urina),

— ugotovitve nekropsije,

— podroben opis vseh histopatoloških ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov z opisom uporabljene metode,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS STRUPENOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE NA ENI GENERACIJI

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se daje dnevno, v graduiranih odmerkih, nekaj skupinam samcev in samic. Samcem je treba dajati odmerke med rastjo in tekom najmanj enega zaključenega cikla spermatogeneze (približno 56 dni pri miših in 70 dni pri podganah), da bi preskusna snov lahko povzročila škodljive učinke na spermatogenezo.

Samicam iz starševske generacije (P) je treba odmerke dajati tekom najmanj dveh zaključenih pojatvenih ciklusov, da bi preskusna snov lahko povzročila škodljive učinke na pojatev. Živali se potem parijo. Preskusna snov se daje obema spoloma v času parjenja, pozneje pa samo še samicam v času brejosti in dokler traja dojenje.

Za dajanje z inhalacijo je treba metodo prilagoditi.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Pred preskusom se naključno izberejo zdrave mlade živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine. Živali se vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih najmanj pet dni pred preskusom.

Preskusno snov je priporočljivo dajati s hrano ali v pitni vodi. Sprejemljivi so tudi drugi načini dajanja. Vsem živalim je treba dajati odmerke z enako metodo v ustreznem preskusnem obdobju. Če se za lažje dajanje odmerkov uporabi nosilec ali drugi dodatki, se je treba prepričati, da le-ti ne povzročajo strupenih učinkov.

Odmerke je treba dajati sedem dni na teden.

Preskusne živali

Izbor vrst

Priporočeni vrsti sta miš in podgana. Uporabiti je treba zdrave živali, ki niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Sevi z nizko plodnostjo naj se ne uporabljajo. Preskusne živali je treba opredeliti po vrsti, sevu, spolu, teži in/ali starosti.

Za ustrezno oceno plodnosti je treba preučiti samce in samice. Vse preskusne in kontrolne živali je treba odstaviti od sesanja pred začetkom dajanja odmerkov.

Število in spol

Vsaka preskusna in kontrolna skupina naj ima zadostno število živali, da bo pri ali tik pred rokom skotitve vsebovala okrog 20 brejih samic.

Cilj je ustvariti zadosti primerov brejosti in mladičev, s čimer se zagotovi pomenljiva ocena zmožnosti učinkovanja snovi na plodnost, brejost in materinsko vedenje v starševski P generaciji živali, ter na sesanje, rast in razvoj mladičev F1 od zaploditve do odstavitve od sesanja.

Preskusni pogoji

Hrano in vodo je treba priskrbeti *ad libitum*. Ko se bliža kotitev, je treba breje samice razvrstiti po materinskih kletkah ali kletkah za kotitev posamezno ter priskrbeti material za izdelavo gnezda.

Velikosti odmerka

Uporabiti je treba najmanj tri preskusne in eno kontrolno skupino. Če je pri dajanju preskusne snovi uporabljen nosilec, naj bi kontrolna skupina prejela nosilec v največji uporabljeni velikosti. Če preskusna snov povzroči manjši vnos ali izkoristek hrane, potem bi bila lahko potrebna uporaba paralelne kontrolne skupine za hrano. V najboljšem primeru najvišja velikost odmerka, razen če je ne omejujejo fizikalne/kemijske lastnosti ali biološki učinki preskusne snovi, povzroči strupenost, vendar ne smrtnosti, pri starševskih (P) živalih. Srednja velikost ali velikosti odmerka naj povzročijo minimalne strupene učinke, ki se jih lahko pripiše preskusni snovi, nizek odmerek pa ne bi sme povzročiti nikakršnih vidnih škodljivih učinkov na starših ali potomcih. Kadar se odmerek posameznim živalim daje z gavažo ali s kapsulo, ga je treba odmeriti na podlagi telesne mase posamezne živali in tedensko prilagajati spremembam telesne mase. Pri samicah v času brejosti lahko odmerki temeljijo na telesni masi na dan brejosti 0 ali 6, če je tako želeno.

Mejni preskus

V primeru snovi nizke strupenosti, kadar velikost odmerka najmanj 1 000 mg/kilogram ne povzroči nikakršnih znakov motenja razmnoževanja, študije pri drugih velikostih odmerka verjetno ne bodo potrebne. Če predhodna študija pri visoki velikosti odmerka z jasnimi znaki maternalne strupenosti ne pokaže nikakršnih škodljivih učinkov na plodnost, študije pri drugih velikosti odmerka verjetno ne bodo potrebne.

Izvajanje preskusa

Časovni razpored preskusa

Vsakodnevno dajanje odmerkov starševskim (P) samcem naj se začne pri starosti okrog pet do devet tednov, potem ko so že najmanj pet dni odstavljeni od sesanja in prilagojeni preskusnim pogojem. Pri podganah se dajanje odmerkov nadaljuje 10 tednov pred obdobjem parjenja (osem tednov pri miših). Samce je treba usmrtiti in pregledati ali na koncu obdobja parjenja ali pa se lahko ohranijo na preskusni hrani za morebitno produkcijo drugega zaroda in se usmrtijo in pregledajo enkrat pred koncem študije. Pri starševskih (P) samicah se dajanje odmerkov začne najmanj po petih dneh prilagajanja preskusnim pogojem in se nadaljuje najmanj dva tedna pred parjenjem. Vsakodnevno dajanje odmerkov starševskim samicam naj se nadaljuje še skozi tritedensko obdobje parjenja, brejosti in vse do odstavitve od sesanja mladičev F1. Upoštevati je treba spremembe časovnega razporeda dajanja odmerkov, utemeljenega na drugih razpoložljivih informacijah o preskusni snovi, kot je indukcija metabolizma ali bioakumulacije.

Postopek parjenja

Pri preskusih strupenosti za razmnoževanje je mogoče uporabiti parjenje v razmerju ali 1:1 (en samec na eno samico) ali 1:2 (en samec na dve samici).

Pri parjenju 1:1 se samica nastani z istim samcem vse do spočetja ali dokler ne potečejo trije tedni. Vsako jutro se samice pregledajo za prisotnost semenčec ali vaginalnih zamaškov. Dan 0 brejosti je dan, ko se odkrije vaginalni zamašek ali semenčeca.

Tiste pare, ki se ne uspejo spariti, je treba preučiti, da bi se določil vzrok navidezne neplodnosti. To lahko zajema postopke, kot so omogočanje dodatnih priložnosti za parjenje z drugimi dokazanimi očeti samci ali materami samicami, mikroskopski pregledi razmnoževalnih organov in pregled pojatvenega ciklusa ali spermatogeneze.

Velikosti zaroda

Živalim, ki jim je dan odmerek med študijo plodnosti, se omogoči, da skotijo na normalen način in vzredijo svoje mladiče do odstavitve od sesanja brez standardiziranja zarodov.

Kjer se opravi standardizirane zaroda, se predlaga naslednji postopek. V času od prvega do četrtega dne po skotitvi se lahko velikost vsakega zaroda prilagodi z izločitvijo odvečnih mladičev, da bi se dobilo, če je to mogoče, štiri samce in štiri samice na zarod. Kadar število mladih samcev in samic ne omogoča, da bi jih v vsakem zarodu bilo po štiri na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer, pet samcev in tri samice). Prilagoditve se ne uporabljajo za primer zarodov z manj kot osmimi mladiči.

Opazovanja

Tekom celotnega preskusnega obdobja je treba žival opazovati najmanj enkrat dnevno. Ustrezne vedenjske spremembe, znake težke ali podaljšane kotitve in vse znake strupenosti, vključno s smrtnostjo, je treba zabeležiti. V obdobju pred in med parjenjem je treba vsak dan meriti porabo hrane. Po kotitvi in v času dojenja je treba merjenje porabe hrane (hkrati z merjenjem porabe vode, kadar se preskusna snov daje s pitno vodo) meriti na isti dan, kot se tehta zarod. Starševske samce in samice je treba stehtati prvi dan dajanja odmerka, potem pa enkrat tedensko. O navedenih opazovanjih je treba poročati za vsako odraslo žival posebej.

Trajanje brejosti je treba računati od dneva 0 brejosti. Vsak zarod je treba pregledati čim prej po skotitvi, da bi se določilo število in spol mladičev, mrtvorojene in živorojene živali ter prisotnost vidnih anomalij.

Mrtve mladiče in mladiče, žrtvovane na četrti dan, je treba shraniti in preučiti glede možnih okvar. Žive mladiče je treba prešteti in zarode stehtati na jutro po skotitvi, četrti in sedmi dan ter potem še enkrat tedensko do zaključka študije, ko je treba živali stehtati posamezno. Zabeležiti je treba fizične in vedenjske abnormalnosti, opažene na materah samicah ali mladičih.

Patologija

Nekropsija

Ob žrtvovanju ali smrti med študijo je treba na živalih iz starševske generacije opraviti makroskopski pregled, da bi se odkrile vse strukturalne abnormalnosti ali patološke spremembe, pri čemer se posebno pozornost posveti na razmnoževalnemu sistemu. Mrtve ali umirajoče mladiče je treba pregledati, da bi se odkrile okvare.

Histopatologija

Jajčnike, maternico, maternični vrat, vagino, moda, obmodke, semenjake, prostato, sprednji reženj prostate, hipofizo in ciljne organe vseh starševskih živali je treba shraniti za mikroskopski pregled. V primeru, da ti organi niso bili pregledani v drugih študijah z večkratnimi odmerki, jih je treba, kadar je to izvedljivo, mikroskopsko pregledati na vseh živalih iz skupine z visokim odmerkom in kontrolne skupine ter na živalih, ki so umrle med študijo.

Organe, ki na navedenih živalih pokažejo abnormalnosti, je treba potem pregledati še na vseh ostalih starševskih živalih. V teh primerih je treba opraviti mikroskopski pregled vseh tkiv, ki kažejo vidne patološke spremembe. Kot je bilo predlagano v okviru postopkov parjenja, se mikroskopskemu pregledu lahko izpostavijo razmnoževalni organi živali, pri katerih se sumi neplodnost.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število plodnih samcev, število brejih samic, tipe sprememb in odstotek živali, ki kažejo določen tip spremembe.

Kadar je to mogoče, je treba numerične rezultate oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— uporabljena vrsta/sev,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku, vključno z rodnostjo, brejostjo in sposobnostjo preživetja,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do načrtovanega žrtvovanja ali do zaključka študije,

— tabela, na kateri so prikazane teže vsakega zaroda, povprečne teže mladičev ter posamezne teže mladičev na zaključku,

— strupeni ali drugi učinki na razmnoževanje, mladiče in poporodni rasti,

— dan opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o telesni masi starševskih živali,

— ugotovitve nekropsije,

— podroben opis vseh mikroskopskih ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov, kadar je to mogoče,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS STRUPENOSTI ZA RAZMNOŽEVANJE NA DVEH GENERACIJAH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se daje dnevno, v graduiranih odmerkih, nekaj skupinam samcev in samic. Samcem starševske generacije (P) je treba dajati odmerke med rastjo in v času najmanj enega zaključenega cikla spermatogeneze (približno 56 dni pri miših in 70 dni pri podganah), da bi preskusna snov lahko povzročila škodljive učinke na spermatogenezo.

Samicam iz starševske generacije (P) je treba odmerke dajati tekom najmanj dveh zaključenih pojatvenih ciklusov, da bi preskusna snov lahko povzročila škodljive učinke na pojatev. Živali se potem parijo. Preskusna snov se daje obema spoloma v času parjenja, pozneje pa samo še samicam v času brejosti in dokler traja obdobje dojenja. Po odvrnitvi od sesanja se dajanje snovi nadaljuje na mladičih F1 med njihovo rastjo v odraslo žival, parjenjem in produkcijo generacije F2, vse dokler se generacija F2 ne odstavi od sesanja. Za dajanje z inhalacijo je treba metodo prilagoditi.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Pred preskusom se naključno izberejo zdrave živali in se razporedijo v preskusne ter kontrolne skupine. Starševske živali (P) se najmanj pet dni pred preskusom vzdržujejo v preskusnih nastanitvenih in prehranjevalnih pogojih. Preskusno snov je priporočljivo dajati s hrano ali v pitni vodi. Sprejemljivi so tudi drugi načini dajanja. Vsem živalim je treba dajati odmerke z enako metodo v celotnem preskusnem obdobju. Če se za lažje dajanje odmerkov uporabi nosilec ali drugi dodatki, se je treba prepričati, da ti ne povzročajo strupenih učinkov. Odmerke je treba dajati sedem dni na teden.

Preskusne živali: izbor vrst

Priporočeni vrsti sta miš ali podgana.

Uporabiti je treba zdrave starševske živali, ki niso bile izpostavljene predhodnim preskusnim postopkom. Sevi z nizko plodnostjo naj se ne uporabljajo. Preskusne živali je treba opredeliti po vrsti, sevu, spolu, teži in/ali starosti.

Za ustrezno oceno plodnosti je treba preučiti samce in samice. Vse preskusne in kontrolne živali je treba odstaviti od sesanja pred začetkom dajanja odmerkov.

Število in spol

Vsaka preskusna in kontrolna skupina mora zajemati zadostno število živali, da bi pri ali tik pred rokom skotitve vsebovala okrog 20 brejih samic. Cilj je ustvariti zadosti brejosti in mladičev, s čimer se zagotovi pomenljiva ocena zmožnosti učinkovanja snovi na plodnost, brejost in materinsko vedenje, na sesanje, rast in razvoj mladičev F1 od zaploditve do zrelosti ter na razvoj njihovih mladičev (F2) do odvrnitve od sesanja.

Preskusni pogoji

Hrano in vodo je treba priskrbeti *ad libitum*. Ko se bliža kotitev, je treba breje samice razvrstiti po materinskih kletkah ali kletkah za kotitev posamezno ter priskrbeti material za izdelavo gnezda.

Velikosti odmerka

Uporabiti je treba najmanj tri preskusne in eno kontrolno skupino. Če je pri dajanju preskusne snovi uporabljen nosilec, naj bi kontrolna skupina sprejela nosilec v največji uporabljeni velikosti. Če preskusna snov povzroči manjši vnos ali izkoristek hrane, potem bo morda potrebna uporaba paralelne kontrolne skupine za hrano. V najboljšem primeru najvišja velikost odmerka, razen če je ne omejujejo fizikalne/kemijske lastnosti ali biološki učinki preskusne snovi, povzroči strupenost, vendar ne smrtnosti, pri starševskih (P) živalih. Srednja velikost ali velikosti odmerka naj povzročijo minimalne strupene učinke, ki naj bi bili posledica delovanja preskusne snovi, nizek odmerek pa ne bi sme povzročiti nikakršnih vidnih škodljivih učinkov na starših ali mladičih. Kadar se odmerek daje posameznim živalim z gavažo ali s kapsulo, ga je treba odmeriti na podlagi telesne mase posamezne živali in tedensko prilagajati spremembam telesne mase. Pri samicah v času brejosti lahko odmerek temelji na telesni masi na dan brejosti 0 ali 6, če je tako želeno.

Mejni preskus

V primeru snovi nizke strupenosti, kadar velikost odmerka najmanj 1 000 mg/kilogram ne povzroči nikakršnih znakov motenja razmnoževanja, študije pri drugih velikostih odmerka verjetno ne bodo potrebne. Če predhodna študija pri visoki velikosti odmerka z jasnimi znaki maternalne strupenosti ne pokaže nikakršnih škodljivih učinkov na plodnost, študije pri drugih velikosti odmerka verjetno ne bodo potrebne.

Izvajanje preskusa

Časovni razpored preskusa

Vsakodnevno dajanje odmerkov starševskim (P) samcem naj se začne pri starosti okrog pet do devet tednov, potem ko so že najmanj pet dni odstavljeni od sesanja in prilagojeni preskusnim pogojem. Pri podganah se dajanje odmerkov nadaljuje 10 tednov pred obdobjem parjenja (osem tednov pri miših). Samce je treba usmrtiti in pregledati na koncu obdobja parjenja ali pa se lahko ohranijo na preskusni hrani za morebitno produkcijo drugega zaroda in se usmrtijo in pregledajo enkrat pred koncem preskusa.

Pri starševskih (P) samicah se dajanje odmerkov začne najmanj po petih dneh prilagajanja preskusnim pogojem in se nadaljuje najmanj dva tedna pred parjenjem. Vsakodnevno dajanje odmerkov starševskim samicam naj se nadaljuje še skozi tritedensko obdobje parjenja, brejosti in vse do odstavitve od sesanja mladičev F1. Upoštevati je treba morebitne spremembe časovnega razporeda dajanja odmerkov, ki bi bile utemeljene na podlagi na drugih razpoložljivih informacijah o preskusni snovi, kot je indukcija metabolizma ali bioakumulacije.

Dajanje odmerkov živalim F1 se začne po odvrnitvi od sesanja in konča, ko so žrtvovane.

Postopek parjenja

Pri preskusih strupenosti za razmnoževanje je mogoče uporabiti parjenje v razmerju ali 1:1 (en samec na eno samico) ali 1:2 (en samec na dve samici).

Pri parjenju 1:1 se samico nastani z istim samcem vse do spočetja ali dokler ne potečejo trije tedni. Vsako jutro se samice pregledajo za prisotnost semenčec ali vaginalnih zamaškov. Dan 0 brejosti je dan, ko se odkrije vaginalni zamašek ali semenčeca. Ob upoštevanju spermiogeneze naj se mladiči F1 ne parijo, dokler niso stari najmanj 11 tednov v primeru miši in 13 tednov v primeru podgan. Za parjenje F1 mladičev se naključno izbere enega samca in eno samico iz vsakega zaroda za križno parjenje z mladičem iz drugega zaroda skupine z enakim odmerkom, da bi se ustvarila F2 generacija. F1 samice in samci, ki niso izbrani za parjenje, se usmrtijo po odstavitvi od sesanja.

Tiste pare, ki se ne uspejo spariti, je treba preučiti, da bi se določil vzrok navidezne jalovosti. To lahko zajema postopke, kot so omogočanje dodatnih priložnosti za parjenje z drugimi dokazanimi očeti samci ali materami samicami, mikroskopski pregledi razmnoževalnih organov in preiskava pojatvenega cikla ali spermatogeneze.

Velikosti zaroda

Živalim, ki jim je dan odmerek med študijo plodnosti, se omogoči, da po skotijo po normalni poti in vzrejajo svoje mladiče do odstavitve od sesanja brez standardiziranja zarodov.

Pri opravljenem standardiziranju se predlaga naslednji postopek. V času od prvega do četrtega dne po skotitvi se lahko velikost vsakega zaroda prilagodi z izločitvijo odvečnih mladičev, da bi se dobilo, kolikor je to mogoče, štiri samce in štiri samice na zarod. Kadar število mladih samcev in samic ne omogoča, da bi jih v vsakem zarodu bilo po štiri na spol, je sprejemljiva tudi delna prilagoditev (na primer pet samcev in tri samice). Prilagoditve se ne uporabljajo za primer zarodov z manj kot osmimi mladiči. Prilagoditve F2 zarodov se opravi na enak način.

Opazovanja

Tekom celotnega preskusnega obdobja je treba vsako posamezno žival opazovati najmanj enkrat dnevno. Ustrezne vedenjske spremembe, znake težke ali podaljšane kotitve in vse znake strupenosti, vključno s smrtnostjo, je treba zabeležiti. V obdobju pred in med parjenjem je treba vsak teden meriti porabo hrane. Poljubno se lahko v času brejosti poraba hrane meri tudi vsak dan. Po kotitvi in v času sesanja je treba merjenje porabe hrane meriti na isti dan, ko se tehtajo zarodi. Starševske živali (P in F1) je treba stehtati prvi dan dajanja odmerka, potem pa enkrat tedensko. O navedenih opazovanjih je treba poročati za vsako odraslo žival posebej.

Trajanje brejosti je treba računati od dneva 0 brejosti. Vsak zarod je treba pregledati čim prej po skotitvi, da bi se določilo število in spol mladičev, mrtvorojene in živorojene živali ter prisotnost vidnih anomalij.

Mrtve mladiče in mladiče, žrtvovane na četrti dan, je treba ohraniti in preučiti glede možnih okvar. Žive mladiče je treba prešteti in zarode stehtati na jutro po kotitvi, četrti in sedmi dan ter potem še enkrat tedensko do zaključka študije, ko je treba živali stehtati posamezno. Zabeležiti je treba fizične in vedenjske abnormalnosti, opažene na materah samicah ali mladičih.

Patologija

Nekropsija

Vse starševske in F1 odrasle živali je treba usmrtiti, ko niso več potrebne za ocenjevanje učinkov na razmnoževanje. F1 mladiče, ki niso bili izbrani za parjenje, in vse F2 mladiče je treba usmrtiti po odstavitvi od sesanja.

V času žrtvovanja ali smrti med študijo je treba na vseh starševskih živalih (P in F1) opraviti makroskopski pregled, da bi se odkrile vse strukturalne abnormalnosti ali patološke spremembe, pri čemer se posebno pozornost usmeri na razmnoževalni sistem. Mrtve ali umirajoče mladiče je treba pregledati, da bi se odkrile okvare.

Histopatologija

Jajčnike, maternico, maternični vrat, vagino, moda, obmodke, semenjake, sprednji reženj prostate, prostato, hipofizo in ciljne organe vseh starševskih in F1 živali je treba shraniti za mikroskopski pregled. V primeru, da ti organi niso bili pregledani v drugih študijah z večkratnimi odmerki, jih je treba, kadar je to izvedljivo, mikroskopsko pregledati na vseh starševskih in F1 živalih, izbranih za parjenje, iz skupine z visokim odmerkom in kontrolne skupine, ter na živalih, ki so umrle med študijo, kadar je to izvedljivo. Organe, na katerih se pri navedenih živalih pokažejo abnormalnosti, je treba potem pregledati še na živalih iz skupin z drugimi odmerki. V teh primerih je treba opraviti mikroskopski pregled vseh tkiv, ki kažejo vidne patološke spremembe. Kot je bilo predlagano v okviru postopkov parjenja, se mikroskopskemu pregledu lahko izpostavijo razmnoževalne organe živali, pri katerih se sumi neplodnost.

2. **PODATKI**

Obdelava rezultatov

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je za vsako preskusno skupino razvidno število živali na začetku preskusa, število brejih živali, tip sprememb in odstotek živali, ki kažejo določen tip spremembe.

Kadar je to mogoče, je treba numerične rezultate oceniti z ustrezno statistično metodo. Uporabiti je mogoče katero koli priznano statistično metodo.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— uporabljena vrsta/sev,

— podatki o odzivu strupenosti po spolu in odmerku, vključno z indeksi rodnosti, brejosti in sposobnosti preživetja,

— čas smrti med študijo ali preživetje živali do zaključka študije,

— tabela, na kateri so prikazane teže vsakega zaroda, povprečne teže mladičev ter posamezne teže mladičev na zaključku,

— strupeni ali drugi učinki na razmnoževanje, mladiče in poporodni rasti,

— dan opazovanja vsakega znaka abnormalnosti in njegov nadaljnji potek,

— podatki o telesni masi starševskih in F1 živali, izbranih za parjenje,

— ugotovitve nekropsije,

— podroben opis vseh mikroskopskih ugotovitev,

— statistična obdelava rezultatov, kadar je to mogoče,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

TOKSIKOKINETIKA

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskusna snov se daje na ustrezen način. Odvisno od namena študije se snov lahko daje v enkratnih ali ponovljenih odmerkih v določenih obdobjih eni ali več skupinam preskusnih živali. Nato se, glede na tip študije, določijo snov in/ali metaboliti v telesnih tekočinah, tkivih in/ali izločkih.

Študije se lahko opravljajo z „neoznačenimi“ ali „označenimi“ oblikami preskusne snovi. Kadar je uporabljen označevalec, mora le-ta biti nameščen na snov tako, da zagotavlja največ podatkov o vplivih spojine.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Zdrave mlade živali se prilagodijo laboratorijskim pogojem najmanj pet dni pred preskusom. Pred preskusom se naključno izberejo živali in se razporedijo v preskusne skupine. V posebnih razmerah se lahko uporabijo zelo mlade živali, breje živali in živali, ki so bile že tretirane.

Preskusni pogoji

Preskusne živali

Študije toksikokinetike se lahko izvajajo na eni ali več ustreznih vrstah živali, pri tem pa je treba upoštevati vrste, ki so uporabljene ali še bodo uporabljene v drugih toksikoloških študijah z isto preskusno snovjo. Kadar se za preskus uporabijo glodalci, nihanje v teži ne sme presegati ± 20 % srednje vrednosti.

Število in spol

V študijah absorpcije in izločanja je treba na začetku imeti po štiri živali za vsako velikost odmerka. Preferenca enega ali drugega spola ni obvezna, v nekaterih okoliščinah pa je treba opraviti študijo na obeh spolih. Če obstajajo razlike v odzivu med spoloma, je treba opraviti preskus na štirih živalih vsakega spola. V primeru študij na neglodalcih se lahko uporabi manj živali.

V študijah porazdelitve v tkivih je treba pri velikosti začetne skupine upoštevati število živali, ki jih je treba žrtvovati ob vsaki časovni točki, ter število časovnih točk, ki jih je treba preveriti.

V študijah metabolizma je velikost skupine odvisna od potreb študije.

V študijah z večkratnimi odmerki in večkratnimi časovnimi točkami je treba pri velikosti skupine upoštevati število časovnih točk in načrtovano(a) žrtvovanje(a), ki pa ne sme obsegati manj kot dve živali. Velikost skupine mora biti zadostna, da zagotovi sprejemljivo opredelitev sprejema, konstantnega nivoja in porabe (če je to primerno) preskusne snovi in/ali metabolitov.

Velikosti odmerka

V primeru dajanja enkratnega odmerka je treba uporabiti najmanj dve velikosti odmerka. Ti dve sta nizka velikost odmerka, pri kateri ni opaženih nikakršnih strupenih učinkov, in visoka velikost odmerka, pri kateri lahko pride do sprememb v toksikokinetičnih parametrih ali pri katerih se pojavijo strupeni učinki.

V primeru dajanja večkratnih odmerkov je nizka velikost odmerka običajno zadostna, vendar pa je v nekaterih okoliščinah visoka velikost odmerka prav tako potrebna.

Način dajanja

Pri izvajanju študij toksikokinetike je treba uporabiti enak način in, če je to primerno, enak nosilec, kot je uporabljen ali bo uporabljen v drugih študijah strupenosti. Preskusna snov se v določenih obdobjih skupinam preskusnih živali običajno daje oralno z gavažo ali s hrano, z nanosom na kožo ali z inhalacijo. Intravenozno dajanje preskusne snovi lahko koristi pri določanju relativne absorpcije pri drugih načinih dajanja. Poleg tega je mogoče pridobiti uporabne podatke o vzorcu porazdelitve kmalu po intravenoznem dajanju snovi.

Upoštevati je treba možnost interference nosilca s preskusno snovjo. Pozornost je treba posvetiti razliki v absorpciji pri dajanju preskusne snovi z gavažo in s hrano ter potrebi po natančni opredelitvi odmerka, zlasti kadar se preskusna snov daje s hrano.

Čas opazovanja

Vse živali je treba dnevno opazovati in beležiti znake strupenosti ter druge ustrezne klinične lastnosti, vključno s časom njihovega nastopa, stopnjo in trajanjem.

Postopek

Po tehtanju preskusnih živali se na ustrezen način daje preskusna snov. Če se zdi potrebno, se lahko živali pred dajanjem preskusne snovi postijo.

Absorpcija

Stopnja in obseg absorpcije dane snovi se lahko ocenita z uporabo različnih metod, z referenčnimi skupinami ([1]) ali brez njih, na primer z:

— določitvijo količine preskusne snovi in/ali metabolitov v izločkih, kot so urin, žolč, fekalije, izdihani zrak in kar ostane v truplu,

— primerjavo biološkega odziva (npr. študije akutne strupenosti) v preskusni ter kontrolni in/ali referenčni skupini,

— primerjavo količine snovi, izločenih skozi ledvice, in/ali metabolitov v preskusni in referenčni skupini,

— določitvijo površine pod krivuljo plazma-nivo/čas preskusne snovi in/ali metabolitov ter primerjavo s podatki iz referenčne skupine.

([1]) V tej metodi je referenčna skupina tista, pri kateri se preskusna snov daje na drug način, kar zagotavlja popolno biorazpoložljivost odmerka.

Porazdelitev

Trenutno sta na voljo dva pristopa, izmed katerih je enega ali oba mogoče uporabiti za analizo porazdelitvenih vzorcev:

— uporabni kvalitativni podatki se pridobijo z uporabo tehnik avtoradiografije celega telesa,

— kvantitativni podatki se pridobijo z žrtvovanjem živali v različnih časovnih obdobjih po izpostavljenosti in z določanjem koncentracije in količine preskusne snovi in/ali metabolitov v tkivih in organih.

Izločanje

V študijah izločanja se zbirajo urin, fekalije in izdihani zrak ter, v nekaterih primerih, žolč. Količino preskusne snovi in/ali metabolitov v teh izločkih je treba meriti nekajkrat po izpostavljenosti, bodisi dokler ni izločenih 95 % danega odmerka bodisi sedem dni zapovrstjo, kar se zgodi prej.

V posebnih primerih je treba upoštevati izločanje preskusne snovi v mleku doječih preskusnih živali.

Metabolizem

Da bi se določil obseg in vzorec metabolizma, je treba z ustreznimi tehnikami analizirati biološke vzorce. Obrazložiti je treba strukture metabolitov in predlagati ustrezne presnovne poti, kadar je treba odgovoriti na vprašanja, ki izhajajo iz predhodnih toksikoloških študij. V pomoč so lahko *in vitro* študije, s katerimi se pridobijo podatki o presnovnih poteh.

Dodatni podatki o odnosu med metabolizmom in strupenostjo se lahko pridobijo iz biokemijskih študij, kot je določitev učinkov presnovnih encimskih sistemov, poraba endogenih neproteinskih sulfidril spojin in vezanje snovi z makromolekulami.

2. PODATKI

Podatke je treba glede na tip izvajane študije povzeti v obliki tabele, podprti z grafičnim prikazom, kadar je to primerno. Za vsako preskusno skupino je treba, kadar je primerno, prikazati srednje in statistične spremembe meritev glede na čas, odmerek, tkiva in organe. Z ustreznimi metodami je treba določiti obseg absorpcije in količino ter stopnje izločanja. Pri izvajanju študij metabolizma je treba prikazati strukturo prepoznanih metabolitov in predstaviti možne presnovne poti.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, vir, okoljski pogoji, hrana,

— opredelitev označenih materialov, kadar so le-ti uporabljeni,

— uporabljene velikosti odmerka in časovni razmiki,

— način(i) dajanja in vsi uporabljeni nosilci,

— opaženi strupeni in drugi učinki,

— metode določanja preskusne snovi in/ali metabolitov v bioloških vzorcih, vključno z izdihanim zrakom,

— tabelni prikaz meritev po spolu, odmerku, režimu, času, tkivih in organih,

— časovni prikaz obsega absorpcije in izločanja,
— metode opredeljevanja in prepoznavanja metabolitov v bioloških vzorcih,
— metode biokemijskih meritev, povezanih z metabolizmom,
— obravnava rezultatov,
— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS MUTAGENOSTI IN PRESEJALNA ŠTUDIJA RAKOTVORNOSTI

GENSKA MUTACIJA – SACCHAROMYCES CEREVISIAE

1. **METODA**

1.1 **Uvod**

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 **Opredelitev pojmov**

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 **Referenčne snovi**

Jih ni.

1.4 **Princip preskusne metode**

Za merjenje nastanka genskih mutacij, ki jih inducirajo kemijski povzročitelji z ali brez metabolne aktivacije, je mogoče uporabiti niz haploidnih in diploidnih sevov kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*.

Uporabljajo se sistemi napredne mutacije v haploidnih sevih, kot je merjenje mutacije rdečih mutant, ki potrebujejo adenin (*ade*-1, *ade*-2), v bele mutante, ki potrebujejo dvojni adenin, ter selektivni sistemi, kot je indukcija odpornosti proti kanavaninu in cikloheksimidu.

Najširše validirani sistem povratne mutacije vključuje uporabo haploidnega seva XV 185-14C, ki nosi ochre nesmiselne mutacije *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 in *trp* 5-48, ki so povratne z mutageni, ki povzročajo zamenjave baz, in inducirajo usmerjene mutacije ali ochre supresorske mutacije. XV 185-14C nosi tudi označevalec *his* 1-7, ki je drugače pomenska mutacija, v glavnem povratna z mutacijami na drugem mestu, ter označevalec *hom* 3-10, ki je povraten z mutageni, ki inducirajo mutacije tipa „premik bralnega okvira“.

Pri diploidnih vrstah *S. cerevisisae* je edina široko uporabljana vrsta D, ki je homozigotna za *ilv* 1-92.

1.5 **Merila kakovosti**

Jih ni.

1.6 **Opis preskusne metode**

Priprave

Raztopino preskusnih kemikalij in kontrolo je treba z uporabo ustreznega nosilca pripraviti tik pred preskusom. Če gre za v vodi netopne organske spojine, naj se ne uporabi več kot 2 % raztopina v/v organskih topil, kot so etanol, aceton ali dimetilsulfoksid (DMSO). Končna koncentracija nosilca ne sme bistveno vplivati na sposobnost preživetja celic in na značilnosti rasti.

Metabolna aktivacija

Celice je treba izpostaviti preskusnim kemikalijam v prisotnosti in v odsotnosti ustreznega eksogenega metabolnega aktivacijskega sistema.

Najpogosteje uporabljeni sistem je s kofaktorjem dopolnjena post-mitohondrijalna frakcija iz jeter glodalcev, ki so bila prej tretirana s sredstvi, za encimsko indukcijo. Za metabolno aktivacijo je lahko ustrezna tudi uporaba drugih vrst, tkiv, post-mitohondrijalnih frakcij ali postopkov.

Preskusni pogoji

Preskusni sevi

V študijah genske mutacije sta najbolj uporabljana haploidni sev XV 185-14C in diploidni sev D_7. Ustrezni so lahko tudi drugi sevi.

Gojišča

Za določitev preživetja celic in števila mutant se uporabijo ustrezna gojišča.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

Pozitivno kontrolo, netretirano kontrolo in kontrolo topila je treba opraviti hkrati. Za vsak specifičen mutacijski ciljni učinek je treba uporabiti ustrezne kemikalije pozitivne kontrole.

Koncentracije izpostavljenosti

Uporabiti je treba najmanj pet ustrezno razporejenih koncentracij preskusne snovi. V primeru strupenih snovi pri najvišji koncentraciji preživetje ne sme pasti pod 5 do 10 %. Z relativno vodotopnimi snovmi je treba preskus opravljati do meje njihove topnosti z uporabo ustreznih postopkov. Za dobro vodotopne nestrupene snovi je treba zgornjo koncentracijo določiti od primera do primera.

Inkubacijski pogoji

Plošče se inkubirajo štiri do sedem dni pri 28 do 30 °C v temi.

Frekvence spontanih mutacij

Uporabljati je treba subkulture s frekvencami spontanih mutacij znotraj dovoljenega razpona.

Število dvojnikov

Za analizo prototrofov, ki so nastali z gensko mutacijo, in sposobnosti preživetja celic je treba uporabiti najmanj tri ponovitvene plošče na koncentracijo. V primeru preskusov, pri katerih se uporabljajo označevalci, kot je *hom* 3-10 z nizko stopnjo mutacije, je treba za pridobitev statistično ustreznih podatkov število plošč povečati.

Postopek

Tretiranje sevov *S. cerevisiae* se običajno izvaja s preskusnim postopkom v tekoči suspenziji, ki zajema ali celice v stacionarni fazi ali rastoče celice. Začetne preskuse je treba opraviti na rastočih celicah: $1 - 5 \times 10^7$ celic/ml se izpostavi preskusni kemikaliji največ 18 ur pri 28 do 37 °C s tresenjem; če je primerno, se med tretiranjem doda ustrezna količina metabolnega aktivacijskega sistema. Na koncu tretiranja se celice centrifugirajo, sperejo in zasejejo na ustrezno gojišče. Po inkubaciji se plošče preštejejo za določitev preživetja in indukcije genske mutacije.

Če je prvi preskus negativen, je treba drugi preskus opraviti z uporabo celic v stacionarni fazi. Če je prvi preskus pozitiven, se ga potrdi z ustreznim neodvisnim preskusom.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je razvidno število preštetih kolonij, število mutant, preživetje in frekvenco mutant. Vse rezultate je treba potrditi z neodvisnim preskusom. Podatke je treba oceniti z uporabo ustreznih statističnih metod.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— uporabljeni sev,

— preskusni pogoji: celice v stacionarni fazi ali rastoče celice, sestava gojišč, inkubacijska temperatura in trajanje, metabolni aktivacijski sistem,

— pogoji tretiranja: stopnje izpostavljenosti, postopek in trajanje tretiranja, temperatura tretiranja, pozitivna in negativna kontrola,

— število preštetih kolonij, število mutant, preživetje in frekvenca mutantov, razmerje odmerek/odziv, če je primerno, statistična ocena podatkov,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

MITOTIČNA REKOMBINACIJA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Mitotično rekombinacijo v *Saccharomyces cerevisiae* je mogoče zaznati med geni (ali bolj splošno med genom in njegovo centromero) ali znotraj genov. Prvi primer se imenuje mitotični crossing-over in ustvarja recipročne produkte, medtem ko je drugi najpogosteje nerecipročen in se imenuje konverzija genov. Preskus crossing-over se običajno opravlja s proizvajanjem recesivnih homozigotnih kolonij ali sektorjev, ki nastanejo v heterozigotnem sevu, medtem ko se preskus konverzije genov opravlja s proizvodnjo prototrofnih revertant, ki nastanejo na avksotrofnem heteroalelnem sevu, ki nosi dva različna okvarjena alela istega gena. Najpogosteje uporabljani sevi za odkrivanje mitotične konverzije genov so D_4 (heteroalelna na *ade* 2 in *trp* 5), D_7 (heteroralelna na *trp* 5), BZ_{34} (heteroalelna na *arg* 4) in JD1 (hetroalelna na *his* 4 in *trp* 5). Mitotični crossing-over, s katerim nastajajo rdeči in rožnati homozigotni sektorji, je mogoče določiti v D_5 ali na D_7 (ki meri tudi mitotično konverzijo genov in povratno mutacijo na *ilv* 1-92), pri čemer sta oba seva heteroalelna za komplementne alele *ade* 2.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Raztopino preskusnih kemikalij ter kontrolo ali referenčne spojine je treba z uporabo ustreznega nosilca pripraviti tik pred preskusom. Če gre za v vodi netopne organske spojine, naj se ne uporabi več kot2 % raztopina v/v organskih topil, kot so etanol, aceton ali dimetilsulfoksid (DMSO). Končna koncentracija nosilca ne sme bistveno vplivati na sposobnost preživetja celic in na značilnosti rasti.

Metabolna aktivacija

Celice je treba izpostaviti preskusnim kemikalijam v prisotnosti in v odsotnosti ustreznega eksogenega metabolnega aktivacijskega sistema. Najpogosteje uporabljeni sistem je s kofaktorjem dopolnjena post-mitohondrijalna frakcija iz jeter glodalcev, ki so bila prej tretirana s sredstvi za indukcijo encimov. Za metabolno aktivacijo je lahko ustrezna tudi uporaba drugih vrst, tkiv, post-mitohondrijalnih frakcij ali postopkov.

Preskusni pogoji

Preskusni sevi

Najpogosteje uporabljani sevi so diploidi D_4, D_5, D_7 in JD1. Ustrezna je lahko tudi uporaba drugih sevov.

Gojišča

Za določitev preživetja celic in frekvence mitotične rekombinacije se uporabijo ustrezna gojišča.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

Pozitivno kontrolo, netretirano kontrolo in kontrolo topila je treba opraviti hkrati. Za vsak specifični ciljni učinek rekombinacije je treba uporabiti ustrezne kemikalije pozitivne kontrole.

Koncentracije izpostavljenosti

Uporabiti je treba najmanj pet ustrezno razporejenih koncentracij preskusne snovi. Med dejavniki, ki jih je treba upoštevati, so citotoksičnost in topnost. Najnižja koncentracija ne sme imeti nikakršnega učinka na sposobnost preživetja celic. V primeru strupenih kemikalij preživetje pri najvišji koncentraciji ne sme pasti pod 5 do 10 %. Z relativno vodotopnimi snovmi je treba preskus opravljati do meje njihove topnosti z uporabo ustreznih postopkov. Za dobro vodotopne nestrupene snovi je treba zgornjo koncentracijo določiti od primera do primera.

Celice se lahko izpostavijo preskusnim kemikalijam ali v njihovi stacionarni fazi ali v času rasti za obdobje največ 18 ur. Za dolga obdobja tretiranja pa je treba kulture mikroskopsko pregledati za nastanek spor, katerih prisotnost bi razveljavila preskus.

Inkubacijski pogoji

Plošče se inkubira v temi štiri do sedem dni pri 28 do 30 °C. Plošče, uporabljene za analizo rdečih in rožnatih homozigotnih sektorjev, ki nastanejo z mitotičnim crossing-over, je treba hraniti v hladilniku (približno 4 °C) za nadaljnji dan ali dva pred štetjem, da se omogoči razvoj ustreznih pigmentiranih kolonij.

Frekvence spontane mitotične rekombinacije

Uporabiti je treba subkulture s frekvencami spontane mitotične rekombinacije znotraj dovoljenega normalnega razpona.

Število dvojnikov

Uporabiti je treba najmanj tri ponovitvene plošče na koncentracijo za analizo prototrofov, ki so nastali z mitotično konverzijo genov, in sposobnosti preživetja celic. V primeru preskusov recesivne homozigotnosti, ki nastane z mitotičnim (crossing-over, je treba število plošč povečati, da bi se dobilo ustrezno število kolonij.

Postopki

Obdelava sevov *S. cerevisiae* se običajno izvaja s preskusnim postopkom v tekoči suspenziji, ki zajema ali celice v stacionarni fazi ali rastoče celice. Začetne preskuse je treba opraviti na rastočih celicah: 1 – 5 x 10^7 celic/ml se izpostavi preskusni kemikaliji največ 18 ur pri 28 do 37 °C s tresenjem; če je primerno, se med tretiranjem doda ustrezna količina metabolnega aktivacijskega sistema.

Na koncu tretiranja se celice centrifugirajo, sperejo in zasejejo na ustrezno gojišče. Po inkubaciji se plošče preštejejo za preživetje in indukcijo genske mutacije.

Če je prvi preskus negativen, je treba ob uporabi celic v stacionarni fazi opraviti drugi preskus. Če je prvi preskus pozitiven, se ga potrdi z ustreznim neodvisnim preskusom.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, iz katere je razvidno število preštetih kolonij, število rekombinant, preživetje in frekvenca rekombinant.

Rezultate je treba potrditi z neodvisnim preskusom.

Podatke je treba oceniti z uporabo ustreznih statističnih metod.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— uporabljeni sevi,

— preskusni pogoji: celice v stacionarni fazi in rastoče celice, sestava gojišč, inkubacijska temperatura in trajanje, metabolni aktivacijski sistem,

— pogoji tretiranja: stopnje izpostavljenosti, postopek in trajanje tretiranja, temperatura tretiranja, pozitivna in negativna kontrola,

— število preštetih kolonij, število rekombinant, preživetje in frekvenca rekombinacije, razmerje odmerek/odziv, če je primerno, statistična ocena podatkov,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS GENSKE MUTACIJE *IN VITRO* NA SESALSKIH CELICAH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Za odkrivanje mutacij, ki jih inducirajo kemijske snovi, se lahko uporabi sistem celičnih kultur sesalcev. Splošno uporabljane celične linije zajemajo mišje limfomske celice L5178Y in CHO ter V-79 linije celic kitajskega hrčka. Najpogosteje uporabljeni sistemi v teh celičnih linijah merijo mutacije na lokusih timidin kinaze (TK), hipoksantin-gvanin-fosforibozil-transferaze (HPRT) ([1]) in Na^+/K^+ ATPaze. TK in HPRT mutacijski sistemi odkrivajo mutacije baznega para, mutacije s premikom bralnega okvirja in majhne delecije; sistem Na^+/K^+ odkriva samo mutacije baznega para.

Celice, ki jim zaradi napredne mutacije $TK^+ - TK^-$ primanjkuje timidin kinaze (TK), so odporne na bromdeoksiuridin (BrdU), fluorodeoksiuridin (FdU) ali trifluorotimidin (TFT), saj ti antimetabolititi niso vključeni v celične nukleotide z „reševalnim“ encimskim sistemom timidin kinaze; nukleotidi, potrebni za celični metabolizem, se pridobijo izključno iz *de novo* sinteze. Vendar pa so v prisotnosti timidin kinaze BrdU, FdU ali TFT vključeni v nukleotide, kar povzroča inhibicijo celičnega metabolizma in citotoksičnosti. Na ta način se mutantne celice lahko delijo v prisotnosti BrdU, FdU ali TFT, medtem ko se normalne celice, ki vsebujejo timidin kinazo, ne morejo. Podobno so celice, ki jim primanjkuje HPRT, selekcionirane na podlagi odpornosti na 8-azagvanin (AG) ali 6-tiogvanin (TG). Celice s spremenjeno Na^+/K^+ ATPazo so selekcionirane na podlagi odpornosti na uabain.

Citotoksičnost se določi z merjenjem učinka preskusnega materiala na sposobnosti tvorbe kolonij (učinkovitost kloniranja) ali stopnje rasti kultur. Frekvenca mutant se določi s cepljenjem znanega števila celic na gojišče s selektivnim sredstvom, da bi se odkrile mutantne celice, ter na gojišče brez selektivnega sredstva, da bi se določile preživele celice. Po ustreznem inkubacijskem obdobju se kolonije preštejejo. Frekvence mutantov se preračunajo iz števila kolonij mutantov, popravljenih za preživetje celic.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Celice

Za ta preskus je na voljo niz celičnih linij. Te vključujejo subklone celic L5178Y, CHO ali V-79 z dokazano občutljivostjo na kemijske mutagene, visoko učinkovitost kloniranja in nizko frekvenco spontanih mutacij. Celice se lahko redno preverjajo za stabilnost kariotipa, treba pa jih je preverjati za okužbo z mikoplazmo. Lahko se uporabijo drugi tipi celic, pod pogojem, da je mogoče popolnoma dokumentirati njihovo veljavnost za preskus kemijsko induciranih genskih mutacij.

([1]) Prej HGPRT.

Gojišče

Uporabiti je treba ustrezno gojišče in inkubacijske pogoje (npr. temperatura, uporabljene posode za kulturo, koncentracije CO_2 in vlažnost). Gojišča in serume je treba izbrati v skladu s selektivnimi sistemi in tipom celic, uporabljenih v preskusu.

Preskusna snov

Preskusne snovi se lahko pripravijo v gojiščih ali raztopijo ali suspendirajo v ustreznih nosilcih pred tretiranjem celic. Končna koncentracija nosilca v sistemu za kulturo ne sme vplivati na sposobnost preživetja celic ali stopnjo rasti.

Metabolna aktivacija

Celice je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in v odsotnosti ustreznega eksogenega metabolnega aktivacijskega sistema sesalcev. Kadar pa so uporabljeni tipi celic z endogeno metabolno aktivacijo, se je treba prepričati, da stopnja in narava aktivnosti ustrezata kemijskemu razredu, ki se preskuša.

Preskusni pogoji

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

V vsak preskus posebej je treba vključiti pozitivne kontrole z uporabo tako neposredno delujočih spojin kot tudi spojine, ki zahteva metabolno aktivacijo; uporabiti je treba tudi negativno kontrolo (kontrola nosilca).

Primeri snovi, ki jih je mogoče uporabiti kot pozitivne kontrole, so naslednji:

— neposredno delujoče spojine:

  — etilmetansulfonat,

  — hikanton,

— posredno delujoče spojine:

  — 2-acetilaminofluoren,

  — 7,12-dimetilbenzantracen

  — N-nitrosodimetilamin.

Kadar je primerno, je mogoče vključiti dodatno pozitivno kontrolo enakega kemijskega razreda, kot je preskušana kemikalija.

Koncentracije izpostavljenosti

Uporabiti je treba nekaj koncentracij preskusne snovi. Te koncentracije naj povzročijo od koncentracije odvisne strupene učinke, pri čemer najvišja koncentracija, povzroča nizko stopnjo preživetja, medtem ko je preživetje pri najnižji koncentraciji približno enako kot v negativni kontroli.

Snovi, relativno netopne v vodi, je treba preskušati do meje njihove topnosti z uporabo ustreznih postopkov. Za dobro vodotopne nestrupene snovi je treba zgornjo koncentracijo določiti od primera do primera.

Postopek

Število uporabljenih celic na kulturo mora biti povezano s frekvenco spontanih mutacij; splošno pravilo je uporaba števila živih celic, ki je 10 kratni inverz frekvence spontanih mutacij.

Celice je treba izpostaviti za ustrezno obdobje, v večini primerov je učinek dosežen po dveh do petih urah. Celice, ki nimajo zadostne endogene metabolne aktivacije, je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in odsotnosti ustreznega metabolnega aktivacijskega sistema. Na koncu obdobja izpostavljenosti se s celic spere preskusna snov in gojijo, da bi se določila sposobnost preživetja in omogočilo izražanje mutantnega fenotipa.

Na koncu ekspresijske dobe, ki mora biti dovolj dolgo, da se omogoči skoraj optimalno izražanje fenotipov induciranih mutantov, se celice vzgajajo na gojišču z in brez selektivnih sredstev, da bi se določilo število mutantov in sposobnost preživetja.

Vsi rezultati se potrdijo v neodvisnem preskusu.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele. Prikazana morajo biti števila posameznih plošč za preskusno snov in kontrolo tako za indukcijo mutacij, kot tudi za preživetje. Podati je treba tudi srednje število kolonij na ploščo in standardno deviacijo. Frekvenco mutacije je treba izraziti s številom mutantov na število preživelih celic. Preživetje in učinkovitosti kloniranja se izrazita kot odstotek stopnje v kontrolne.

Podatke je treba oceniti z uporabo ustreznih statističnih metod.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— uporabljena celična linija, število celičnih kultur, metode vzdrževanja celičnih kultur,

— preskusni pogoji: sestava gojišča, koncentracija CO_2, koncentracija preskusne snovi, uporabljen nosilec, inkubacijska temperatura, inkubacijski čas, dolžina ekspresijske dobe (vključno s številom nacepljenih celic in subkultur ter urniki dodajanja hranil, če je primerno), trajanje tretiranja, gostota celic v času tretiranja, tip uporabljenega metabolnega aktivacijskega sistema sesalcev, pozitivne in negativne kontrole, uporabljena selektivna sredstva,

— utemeljitev izbora odmerka,

— uporabljena metoda za preštetje števila živih in mutantnih celic,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

OKVARE IN POPRAVLJANJE DNK – NENAČRTNA SINTEZA DNK – SESALSKE CELICE *IN VITRO*

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskus nenačrtne sinteze DNK meri repaturno sintezo DNK po izrezu in odstranitvi dela DNK, ki vsebuje mesto okvare, ki so jo inducirali kemijski in fizikalni povzročitelji. Preskus temelji na vključitvi timidina, označenega s tritijem (^{3}H-TdR), v DNK sesalskih celic, ki niso v fazi S celičnega ciklusa. Sprejem ^{3}H-TdR se lahko določi z avtoradiografijo ali tekočinskim scintilacijskim štetjem (LSC) DNK iz tretiranih celic. Sesalske celice v kulturi, razen če se ne uporabljeni primarnih podganjih hepatocitov, se tretirajo s preskusnim sredstvom z ali brez eksogenega metabolnega aktivacijskega sistema. Nenačrtno sintezo DNK je mogoče meriti tudi v *in vivo* sistemih.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Preskusne kemikalije in kontrolne ali referenčne snovi je treba pripraviti na rastnem gojišču ali pa raztopiti ali suspendirati v ustreznih nosilcih ter nato še nadalje razredčiti v rastnem gojišču za uporabo v preskusu. Končna koncentracija nosilca naj ne vpliva na sposobnost preživetja celic.

V preskusu je mogoče uporabiti primarne kulture podganjih hepatocitov, človeške limfocite ali stabilizirane celične linije (npr. človeške diploidne fibroblaste).

Celice je treba izpostaviti preskusni kemikaliji v prisotnosti in v odsotnosti ustreznega metabolnega aktivacijskega sistema.

Preskusni pogoji

Število kultur

Za vsako preskusno točko sta potrebni najmanj dve celični kulturi za avtoradiografijo in šest kultur (ali manj, če je to znanstveno utemeljeno) za določitev nenačrtne sinteze DNK s tekočinskim scintilacijskim štetjem.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

V vsak preskus je treba hkrati vključiti pozitivne in negativne (netretirane in/ali kontrole nosilca) kontrole z in brez metabolne aktivacije.

Primeri pozitivnih kontrol za preskus podganjih hepatocitov vključujejo 7,12- dimetil benzantracen (7,12-DMBA) ali 2-acetilaminofluoren (2-AAF). V primeru stabiliziranih celičnih linij je 4-nitrokinolin-N-oksid (4-NQO) primer pozitivne kontrole za avtoradiografski preskus in preskus tekočinskega scintilacijskega štetja, ki sta opravljena brez metabolne aktivacije; N-dimetil nitrosamin je primer spojine pozitivne kontrole kadar se uporabi metabolni aktivacijski sistem.

Koncentracije izpostavljenosti

Uporabiti je treba več koncentracij preskusne snovi v območju, ustreznem za opredelitev odziva. Najvišja koncentracija mora sprožiti nekaj citotoksičnih učinkov. Snovi, relativno netopne v vodi, je treba preskušati do meje njihove topnosti. Za dobro vodotopne nestrupene snovi je treba zgornjo koncentracijo preskusne kemikalije določiti od primera do primera.

Celice

Za vzdrževanju kultur je treba uporabiti ustrezno rastno gojišče, CO_2 koncentracijo, temperaturo in vlažnost. Stabilizirane celične linije je treba redno preverjati za okužbo z mikoplazmo.

Metabolna aktivacija

Sistem metabolne aktivacije se s kulturami primarnih hepatocitov ne uporablja. Stabilizirane celične linije in limfociti se izpostavijo preskusni snovi v prisotnosti in v odsotnosti ustreznega metabolnega aktivacijskega sistema.

Postopek

Priprava kultur

Stabilizirane celične linije se pridobijo iz založnih kultur (npr. s tripsinizacijo ali z otresanjem), nacepljenih v posodah za kulture v primerni gostoti in inkubiranih pri 37 °C.

Kratkotrajne kulture podganjih hepatocitov se določijo tako, da se sveže ločenim hepatocitom v ustreznem gojišču omogoči pritrditev na rastno podlago.

Kulture človeških limfocitov se pripravijo z uporabo ustreznih tehnik.

Tretiranje kultur s preskusno snovjo

Primarni podganji hepatociti

Sveže izolirane podganje hepatocite se primerno dolgo tretira s preskusno snovjo na gojišču, ki vsebuje ^{3}H-TdR. Na koncu obdobja tretiranja je treba celice odstraniti z gojišča, in ji nato sprati, fiksirati in posušiti. Stekelca je treba potopiti v avtoradiografsko emulzijo (kot alternativo se lahko uporabi tudi odstranjevalni film), izpostaviti, razviti, obarvati in prešteti.

Stabilizirane celične linije in limfociti

Avtoradiografske tehnike: celične kulture se ustrezno dolgo izpostavijo preskusni snovi, čemur sledi tretiranje z ^{3}H-TdR. Čas določa narava snovi, aktivnost metabolnih sistemov in tip celic. Da bi odkrili vrhunec nenačrtne sinteze DNK, je treba ^{3}H-TdR dodati bodisi istočasno s preskusno snovjo bodisi nekaj minut po izpostavljenosti preskusni snovi. Na izbiro med tema dvema postopkoma bodo vplivale možne interakcije med preskusno snovjo in ^{3}H-TdR. Da bi ločili med nenačrtno sintezo DNK in semikonzervativnim podvajanjem DNK je mogoče slednje inhibirati, na primer, z uporabo gojišča brez arginina, nizke vsebnosti seruma ali hidroksiuree na gojišču.

Meritve nenačrtne sinteze DNK s tekočinskim scintilacijskim štetjem: Pred tretiranjem s preskusno snovjo je treba vstop celic v fazo S blokirati, kot je opisano zgoraj; celice je nato treba izpostaviti preskusni kemikaliji, kot je opisano v primeru avtoradiografije. Na koncu inkubacijskega obdobja je treba DNK ekstrahirati iz celic in določiti celotno vsebino DNK ter obseg vključitve ^{3}H-TdR.

Treba je upoštevati, da je pri uporabi človeških limfocitov v zgoraj navedenih tehnikah preprečevanje semikonzervativega podvajanja DNK v nestimuliranih kulturah nepotrebno.

Analiza

Avtoradiografske določitve

Pri določanju nenačrtne sinteze DNK v celicah v kulturi se jedra faze S ne štejejo. Prešteti je treba najmanj 50 celic na koncentracijo. Stekelca je treba kodirati pred štetjem. Na vsakem stekelcu je treba prešteti več široko ločenih poljubnih polj. Količino vključenega ^{3}H-TdR v citoplazmi je treba določiti s preštevanjem treh področij velikosti jedra v citoplazmi vsake preštete celice.

Določitve s tekočinskim scintilacijskim štetjem

Pri določanju nenačrtne sinteze DNK s tekočinskim scintilacijskim štetjem je treba pri vsaki koncentraciji in v kontrolah uporabiti ustrezno število kultur.

Vse rezultate je treba potrditi v neodvisnem preskusu.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele.

2.1 Avtoradiografske določitve

Obseg vključitve ^{3}H-TdR v citoplazmi in število zrnc, najdenih na celičnem jedru, je treba zabeležiti posebej.

Za opis porazdelitve obsega vključitve ^{3}H-TdR v citoplazmi in število zrnc na jedro se lahko uporabi sredina, mediana in modus.

2.2 Določitve s tekočinskim scintilacijskim štetjem

Za namen določitev s tekočinskim scintilacijskim štetjem je treba vključitev ^{3}H-TdR prikazati kot dpm/μg DNK. Srednja vrednost dpm/μg DNK s standardno deviacijo se lahko uporabi za opis porazdelitve vključitve.

Podatke je treba oceniti z uporabo ustreznih statističnih metod.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— uporabljene celice, gostoto in število pasaž v času obdelave, število celičnih kultur,

— uporabljene metode za vzdrževanje celičnih kultur, vključno z gojiščem, temperaturo in koncentracijo CO_2,

— preskusna snov, nosilec, koncentracije in utemeljitev izbora koncentracij, uporabljenih v preskusu,

— podrobnosti o metabolnem aktivacijskem sistemu,

— program tretiranja,

— pozitivne in negativne kontrole,

— uporabljena avtoradiografska tehnika,

— uporabljeni postopki za blokiranje vstopa celic v fazo S,

— uporabljeni postopki za ekstrakcijo DNK in določanje celotne vsebine DNK pri določitvah s tekočinskim scintilacijskim štetjem,

— razmerje odmerek/odziv, kadar je to mogoče,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS IZMENJAVE SESTRSKIH KROMATID *IN VITRO*

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskus izmenjave sestrskih kromatid (SCE) je kratkotrajni preskus za odkrivanje recipročnih izmenjav DNK med sestrskima kromatidama kromosoma, ki se podvaja. Izmenjava sestrskih kromatid predstavlja izmenjavo produktov podvajanja DNK na na videz homolognih lokusih. Proces izmenjave predvidoma zajema razpad in ponovno združitev DNK, čeprav je malo poznanega o njegovi molekularni osnovi. Za odkrivanje izmenjav sestrskih kromatid je potrebnih nekaj načinov diferencialnega označevanja sestrskih kromatid, to pa se lahko doseže z vključitvijo bromdeoksiuridina (BrdU) v kromosomsko DNK za dva celična cikla.

Sesalske celice *in vitro* se izpostavijo preskusni kemikaliji z ali brez sesalskega eksogenega metabolnega aktivacijskega sistema, če je to primerno, in se jih goji skozi dva cikla podvajanja na gojišču, ki vsebuje BrdU. Po obdelavi z inhibitorjem delitvenega vretena (npr. s kolhicinom), da bi se celice akumulirale v metafazi mitoze (C-metafaza), se celice spravijo in opravijo kromosomske priprave.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

— V preskusu je mogoče uporabiti primarne kulture, (človeške limfocite) ali stabilizirane celične linije (npr. celice jajčnikov kitajskega hrčka). Celične linije je treba preveriti za okužbo z mikoplazmo,

— Uporabiti je treba ustrezno gojišče in inkubacijske pogoje (npr. temperatura, posode za gojitev, koncentracija CO_2 in vlažnost).

— Preskusne snovi se lahko pripravijo na gojišču ali raztopijo ali suspendira v ustreznih nosilcih pred tretiranjem celic. Končna koncentracija nosilca v gojitvenem sistemu ne sme bistveno vplivati na sposobnost preživetja celic ali stopnjo rasti, vplive na frekvenco izmenjav sestrskih kromatid pa je treba spremljati z uporabo kontrole s topilom.

— Celice je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in v odsotnosti sesalskega metabolnega aktivacijskega sistema. Kadar pa so uporabljeni tipi celic z endogeno metabolno aktivacijo, morata stopnja in narava aktivnosti ustrezati kemijskemu razredu, ki se preskuša.

Preskusni pogoji

Število kultur

Za vsako preskusno točko je potrebno uporabiti najmanj en dvojnik kultur.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

V vsak preskus je treba vključiti pozitivne kontrole z uporabo neposredno delujoče spojine in spojine, ki zahteva aktivacijo presnove; uporabiti je treba tudi kontrolo nosilca.

Primeri snovi, ki jih je mogoče uporabiti kot pozitivne kontrole, so naslednji:

— neposredno delujoče spojine:

  — etilmetansulfonat,

— posredno delujoče spojine:

  — ciklofosfamid.

Kadar je primerno, se lahko vključi dodatna pozitivna kontrola enakega kemijskega razreda, kot je preskušana kemikalija.

Koncentracije izpostavljenosti

Uporabiti je treba najmanj tri ustrezno razporejene koncentracije preskusne snovi. Najvišja koncentracija mora povzročiti opazne strupene učinke, vendar mora še vedno omogočati ustrezno podvajanje celic. Snovi, relativno netopne v vodi, je treba preskušati do meje njihove topnosti z uporabo ustreznih postopkov. Za dobro vodotopne nestrupene snovi je treba zgornjo koncentracijo preskusne snovi določiti od primera do primera.

Postopek

Priprava kultur

Stabilizirane celične linije se pridobijo iz založnih kultur (npr. s tripsinizacijo ali z otresanjem), nacepljenih v gojitvenih posodah v primerni gostoti in inkubiranih pri 37 °C. V primeru enoplastnih kultur je treba število celic na gojitveno posodo prilagoditi tako, da kulture v času spravila niso konfluentne za dosti več kot 50 %. Uporabijo pa se lahko tudi celice v suspenzijski kulturi. Kulture človeških limfocitov se z uporabo ustreznih tehnik pridobijo iz heparinizirane krvi in inkubirajo pri 37 °C.

Tretiranje

Celice v eksponentni fazi rasti se ustrezno dolgo izpostavijo preskusni snovi; v večini primerov je učinkovito že ena do dve uri, vendar pa se lahko v nekaterih primerih čas obdelave podaljša do dveh zaključenih celičnih ciklov. Celice, ki nimajo zadostne endogene metabolne aktivacije, je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in odsotnosti ustreznega sistema metabolne aktivacije. Na koncu obdobja izpostavljenosti se s celic spere preskusna snov in celice se gojijo skozi dva cikla podvajanja v prisotnosti BrdU. Lahko pa se uporabi tudi drugi postopek, v katerem se celice istočasno izpostavljajo preskusni kemikaliji in BrdU za celoten čas gojitve dveh celičnih ciklov.

Kulture človeških limfocitov se tretirajo v semisinhronih pogojih.

Celice se analizirajo v njihovi drugi delitvi po tretiranju, s čimer se zagotovi, da so bile najobčutljivejše faze celičnega ciklusa izpostavljene kemikaliji. Vse kulture, ki jim je dodan BrdU, se obdelajo v temi ali pri zasenčeni razbeljeni svetlobi žarnic do spravila celic, da bi se kolikor je mogoče zmanjšala fotoliza DNK, ki vsebuje BrdU.

Spravilo celic

Celične kulture se obdelajo z inhibitorjem delitvenega vretena (npr. s kolhicinom) eno do štiri ure pred spravilom. Vsaka kultura se za pripravo kromosomov spravi in predela posebej.

Priprava in obarvanje kromosomov

Pripravki kromosomov se pridobijo s standardnimi citogenetskimi tehnikami. Obarvanje stekelc, za prikaz izmenjav sestrskih kromatid, je mogoče opraviti z več tehnikami (npr. fluorescenca plus Giemsa metoda).

Analiza

Število analiziranih celic naj temelji na spontani frekvenci izmenjave sestrskih kromatid v kontroli. Običajno se za izmenjavo sestrskih kromatid analizira najmanj 25 dobro razvitih metafaz na kulturo. Stekelca se kodirajo pred analizo. Pri človeških limfocitih se analizirajo le metafaze, ki vsebujejo 46 centromerov. Pri stabiliziranih celičnih linija se analizirajo le metafaze, ki vsebujejo ± 2 centromera modalnega števila. Navesti je treba ali je centromerična zamenjava oznake zabeležena kot izmenjava sestrskih kromatid. Rezultate je treba potrditi z neodvisnim preskusom.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele. Za vsako obdelano in kontrolno kulturo posebej je treba navesti število izmenjav sestrskih kromatid za vsako metafazo in število sestrskih kromatid na kromosom za vsako metafazo.

Podatke je treba oceniti z uporabo ustreznih statističnih metod.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— uporabljene celice, metode vzdrževanja celične kulture,

— preskusni pogoji: sestava gojišča, koncentracija CO_2, koncentracija preskusne snovi, uporabljen nosilec, inkubacijska temperatura, čas tretiranja, uporabljen inhibitor delitvenega vretena, njegova koncentracija in trajanje tretiranja z njim, tip uporabljenega sesalskega aktivacijskega metabolnega sistema, pozitivne in negativne kontrole,

— število celičnih kultur na preskusno točko,

— podrobnosti uporabljene tehnike za pripravo stekelc,

— število analiziranih metafaz (podatki, podani za vsako kulturo posebej),

— srednje število izmenjave med sestrskimi kromatidami na celico in na kromosom (podatki, podani za vsako kulturo posebej),

— merila za štetje izmenjav sestrskih kromatid,

— utemeljitev izbora odmerka,

— razmerje odmerek-odziv, če je to primerno,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS SPOLNO VEZANE RECESIVNE SMRTNOSTI NA *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskus spolno vezane recesivne smrtnosti (SLRL) z uporabo *Drosophile melanogaster* odkriva pojavnost mutacij, in sicer točkastih mutacij in majhnih delecij, v zarodni liniji žuželke. Ta preskus je preskus napredne mutacije, ki je sposoben odkriti mutacije na približno 800 lokusih kromosoma X; to predstavlja približno 80 % vseh lokusov kromosoma X. Kromosom X predstavlja približno eno petino celotnega haploidnega genoma.

Mutacije v kromosomu X *Drosophile melanogaster* se fenotipično izražajo na samcih, ki nosijo mutantni gen. Kadar je mutacija v hemizigotnih pogojih letalna, se na njeno prisotnost sklepa iz odsotnosti enega razreda zaroda samcev od dveh, ki jih običajno proizvede heterozigotna samica. Preskus spolno vezane recesivne smrtnosti izkorišča ta dejstva s pomočjo posebej označenih in razporejenih kromosomov.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Zaloge

Uporabijo se lahko samci natančno opredeljenih zalog divjega tipa in samice zaloge seva Muller-5. Lahko pa se uporabijo tudi zaloge samic, ki so primerno označene z večkrat invertiranim kromosomom X.

Preskusna snov

Preskusne snovi je treba raztopiti v vodi. V vodi netopne snovi, se lahko raztopijo ali suspendirajo v ustreznih nosilcih (npr. mešanica etanola in Tween-60 ali 80), nato pa pred dajanjem razredčijo v vodi ali raztopini soli. Za nosilec naj se ne uporablja dimetilsulfoksid (DMSO).

Število živali

Preskus je treba zasnovati z vnaprej določeno občutljivostjo in močjo. Frekvenca spontanih mutacij, opažena v ustrezni kontroli, bo vplivala na število tretiranih kromosomov, ki morajo biti analizirani.

Način dajanja

Izpostavljenost je lahko oralna, z injekcijo ali pa se živali izpostavijo plinom ali hlapom. Hranjenje s preskusno snovjo se lahko opravi z raztopino sladkorja. Kadar je potrebno, se lahko snovi raztopijo v 0,7 % raztopini NaCl in vbrizgnejo v prsni koš ali trebuh.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

Vključiti je treba negativne (nosilec) in pozitivne kontrole. Če pa so na razpolago ustrezni laboratorijski pretekli kontrolni podatki, sočasne kontrole niso potrebne.

Stopnje izpostavljenosti

Uporabiti je treba tri stopnje izpostavljenosti. Za predhodno oceno se lahko uporabi ena stopnja izpostavljenosti preskusni snovi, ki je bodisi maksimalna tolerirana koncentracija ali ki kaže nekaj znakov strupenosti. V primeru nestrupenih snovi je treba uporabiti izpostavljenost maksimalnim izvedljivim koncentracijam.

Postopek

Samci divjega tipa (stari tri do pet dni) se tretirajo s preskusno snovjo in parijo posamezno s presežnim številom samic, ki se še niso parile, iz zaloge Muller-5 ali iz druge zaloge, ustrezno označene (z večkrat invertiranim kromosomom X),. Samice se vsake dva do tri dni zamenjajo s takimi, ki se še niso parile, da se pokrije celoten cikel zarodnih celic. Na zarodu teh samic se zabeležijo letalni učinki, ki ustrezajo učinkom na zrelo spermo, spermatide srednje in zadnje faze, zgodnje spermatide, spermatocite in spermatogonije v času tretiranja.

Heterozigotnim samicam F_1 iz zgoraj navedenih križanj se omogoči posamezno parjenje (tj. ena samica na fiolo) s svojimi brati. V generaciji F_2 se pri vsaki kontroli zabeleži odsotnost samcev divjega tipa. Če se izkaže, da je kultura nastala iz samice F_1, ki v starševskem kromosomu X nosi letalni gen (tj. ne opazi se samcev z tretiranim kromosomom), je treba potomke te samice z enakim genotipom preskušati, da bi se ugotovilo, ali se smrtnost ponovi v naslednji generaciji.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele, da se pokaže število preskušanih kromosomov X, število neplodnih samcev in število letalnih kromosomov pri vsaki koncentraciji izpostavljenosti in za vsako obdobje parjenja vsakega posameznega tretiranega samca. Navesti je treba število skupin različnih velikosti na vsakega samca. Navedene rezultate je treba potrditi v posebnem preskusu.

Pri oceni preskusov spolno vezane recesivne smrtnosti je treba uporabiti ustrezne statistične metode. Treba je upoštevati in z ustrezno statistično metodo oceniti kopičenje recesivnih letalnih genov, ki izhajajo od enega samca.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— zaloga: zaloge *Drosophila* ali uporabljeni sevi, starost žuželk, število tretiranih samcev, število sterilnih samcev, število stabiliziranih F_2 kultur, število F_2 kultur brez potomcev, število kromosomov, ki nosijo letalni gen, opaženo v vsaki fazi zarodne celice,

— merila določanja velikosti tretiranih skupin,

— preskusni pogoji: podroben opis programa tretiranja in vzorčenja, stopnje izpostavljenosti, podatki o strupenosti, negativne (topilo) in pozitivne kontrole, če je to primerno,

— merila za štetje letalnih mutacij,

— razmerje izpostavljenost/učinek, kjer je mogoče,

— ocena podatkov,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 Ocena in razlaga

Glej Splošni uvod dela B.

4. VIRI

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUSI CELIČNE TRANSFORMACIJE SESALSKIH CELIC *IN VITRO*

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Za odkrivanje fenotipskih sprememb *in vitro*, ki jih inducirajo kemijske snovi, povezane z maligno transformacijo *in vivo*, se lahko uporabijo sistemi sesalskih celičnih kultur. Med splošno uporabljane celice spadajo C3H10T½, 3T3, SHE in podgane Fischer, preskusi pa temeljijo na spremembah v celični morfologiji, oblikovanju žarišč ali spremembah na izgubi pritrjevalne odvisnosti celic v poltrdnem agarju. Obstajajo tudi redkeje uporabljani sistemi, ki odkrivajo fiziološke ali morfološke spremembe v celicah po izpostavljenosti rakotvornim kemikalijam. Niti eden od ciljnih učinkov preskusa *in vitro* nima določene mehanistične povezave z rakom. Nekateri preskusni sistemi lahko odkrijejo promotorje tumorjev. Citotoksičnost se lahko določi z merjenjem učinka preskusnega materiala na sposobnosti tvorbe kolonij (učinkovitost kloniranja) ali na stopnje rasti kultur. Namen merjenja citotoksičosti je ugotoviti, ali je bila izpostavljenost preskusni kemikaliji toksikološko relevantna, ni pa mogoče z njim izračunati frekvenco transformacije v vseh preskusih, saj lahko nekateri vsebujejo podaljšano inkubacijo in/ali ponovni razmaz na plošče.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Celice

Odvisno od uporabljanega preskusa transformacije je na voljo niz celičnih linij ali primarnih celic. Raziskovalec mora zagotoviti, da celice v opravljanem preskusu kažejo ustrezno fenotipsko spremembo po izpostavljenosti znanim rakotvornim snovem in da sta veljavnost in zanesljivost preskusa, ki se ga opravlja v raziskovalčevem laboratoriju, dokazljivi in dokumentirani.

Gojišče

Uporabiti je treba gojišča in preskusne pogoje, ki ustrezajo izvajanemu preskusu transformacije.

Preskusna snov

Preskusne snovi se lahko pripravijo v gojišču ali raztopijo ali suspendirajo v ustreznih nosilcih tik pred tretiranjem celic. Končna koncentracija nosilca v gojitvenem sistemu ne sme vplivati na sposobnost preživetja celic, stopnjo rasti ali pojav transformacije.

Metabolna aktivacija

Celice je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in v odsotnosti ustreznega metabolnega aktivacijskega sistema. Kadar pa so uporabljeni tipi celic z endogeno metabolno aktivacijo, se je treba prepričati, da narava aktivnosti ustreza kemijskemu razredu, ki se preskuša.

Preskusni pogoji

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

V vsak preskus je treba vključiti pozitivne kontrole z uporabo neposredno delujoče spojine ter spojine, ki zahteva metabolno aktivacijo; uporabiti je treba tudi negativno kontrolo (nosilec).

Primeri snovi, ki jih je mogoče uporabiti kot pozitivne kontrole, so naslednji:

— Neposredno delujoče kemikalije:

  — etilmetansulfonat,

  — β-propiolakton,

— Spojine, ki zahtevajo aktivacijo presnove:

  — 2-acetilaminofluoren,

  — 4-dimetil aminoazobenzen

  — 7,12-dimetilbenzantracen.

Kadar je primerno, je treba vključiti dodatno pozitivno kontrolno enakega kemijskega razreda, kot je preskušana spojina.

Koncentracije izpostavljenosti

Uporabiti je treba nekaj koncentracij preskusne snovi. Te koncentracije morajo povzročiti s koncentracijo povezane učinke strupenosti, pri čemer najvišja koncentracija povzroča nizko stopnjo preživetja, preživetje v najnižji koncentraciji pa mora biti približno enako kot v negativni kontroli. Snovi, relativno netopne v vodi, je treba preskušati do meje njihove topnosti z uporabo ustreznih postopkov. Za dobro vodotopne nestrupene snovi je treba zgornjo koncentracijo preskusne snovi določiti od primera do primera.

Postopek

Celice je treba izpostaviti za ustrezno obdobje, odvisno od uporabljenega preskusnega sistema, to pa lahko pri podaljšani izpostavljenosti vključuje ponovno dajanje odmerka ob spremembi gojišča (in, če je potrebno, sveže mešanice za metabolno aktivacijo). Celice, ki nimajo zadostne endogene metabolne aktivacije, je treba izpostaviti preskusni snovi v prisotnosti in odsotnosti ustreznega metabolnega aktivacijskega sistema. Na koncu obdobja izpostavljenosti se s celic spere preskusna snov in celice se gojijo v pogojih, ki ustrezajo spremljanemu transformiranega fenotipa ter pojavnosti nekatere transformacije. Vsi rezultati se potrdijo v neodvisnem preskusu.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele, ti pa so lahko zelo različni, odvisno od uporabljenega preskusa, npr. število kolonij ali žarišč na ploščo, pozitivne plošče ali število transformiranih celic. Kadar je primerno, je treba preživetje izraziti kot odstotek kontrolne stopnje in frekvence transformacij izražene s številom transformantov na število preživelih celic. Podatke je treba oceniti z uporabo ustreznih statističnih metod.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu glede na tip izvajane študije vključijo naslednji podatki:

— uporabljen tip celic, število celičnih kultur, metode vzdrževanja celičnih kultur,

— preskusni pogoji: koncentracija preskusne snovi, uporabljen nosilec, inkubacijski čas, trajanje in frekvenca tretiranja, gostota celic v času tretiranja, tip uporabljenega eksogenega metabolnega aktivacijskega sistema, pozitivne in negativne kontrole, določitev spremljanega fenotipa, uporabljen selektivni sistem (če je primerno), utemeljitev izbora odmerka,

— metoda preštevanja živih in transformiranih celic,
— statistična ocena,
— obravnava rezultatov,
— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS DOMINANTNE SMRTNOSTI NA GLODALCIH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Učinki dominantne smrtnosti povzročajo embrionalno ali fetalno smrt. Indukcija dominantno letalnih genov zaradi izpostavljenosti kemijski snovi kaže, da snov deluje na zarodno tkivo preskusnih vrst. Na splošno velja, da so dominantni letalni geni posledica kromosomske okvare (strukturne in numerične anomalije). Če gre za tretiranje samic, so lahko embrionalne smrti tudi posledica strupenih učinkov.

Na splošno se samci izpostavijo preskusni spojini in parijo z netretiranimi samicami, ki se še niso parile. Preskušajo se lahko različni stadiji zarodnih celic ločeno, z zaporednimi intervali parjenja. Porast števila mrtvih ugnezditev na samico v tretirani skupini nad številom mrtvih ugnezditev na samico v kontrolni skupini kaže na izgubo po ugnezditvi. Izguba pred ugnezditvijo se lahko oceni na podlagi števil *corpora lutea* ali s primerjavo skupnega števila ugnezditev na samico v preskusni in kontrolni skupini. Skupen dominantni letalni učinek je vsota izgub pred in po ugnezditvi. Izračun skupnega dominantnega smrtnega učinka temelji na primerjavi živih ugnezditev na samico v preskusni skupini z živimi ugnezditvami na samico v kontrolni skupini. Zmanjšanje števila ugnezditev v določenih presledkih je lahko rezultat uničenja celic (npr. spermatocit in/ali spermatogonijev).

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Kadar je mogoče, je treba preskusne snovi raztopiti ali suspendirati v izotonični raztopini soli. Kemikalije, netopne v vodi, se lahko raztopijo ali suspendirajo v ustreznem nosilcu. Uporabljeni nosilec ne sme interferirati s preskusno kemikalijo niti povzročati strupenih učinkov. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije.

Preskusni pogoji

Način dajanja

Preskusna spojina se na splošno da le enkrat. Na podlagi toksikoloških podatkov je mogoče uporabiti tudi ponavljajoči program tretiranja. Običajna načina dajanja sta oralna intubacija ali intraperitonealna injekcija. Ustrezni so tudi drugi načini dajanja.

Preskusne živali

Kot preskusne vrste se priporočajo podgane ali miši. Naključno se izberejo zdrave in spolno popolnoma zrele živali in se razporedijo v preskusne in kontrolne skupine.

Število in spol

Uporabiti je treba ustrezno število tretiranih samcev, da se lahko upošteva spontano spremembo ocenjevane biološke lastnosti. Izbrano število naj temelji na vnaprej določeni občutljivosti zaznavanja in vrednosti značilnosti. Na primer, v tipičnem preskusu bi moralo biti število samcev zadosti veliko, da omogoči od 30 do 50 brejih samic na interval parjenja.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

Na splošno je treba v vsak preskus vključiti sočasne pozitivne in negativne (nosilec) kontrole. Kadar so na voljo sprejemljivi rezultati pozitivne kontrole iz preskusov, ki so bili pred kratkim izvajani v istem laboratoriju, jih je mogoče uporabiti namesto sočasne pozitivne kontrole. Snovi pozitivne kontrole je treba uporabiti v ustrezno nizkem odmerku (npr. MMS, intraperitonealno, pri 10 mg/kilogram), da bi se dokazala občutljivost preskusa.

Velikosti odmerka

Običajno se uporabijo tri velikosti odmerka. Odmerek visoke velikosti mora povzročiti znake strupenosti ali zmanjšano plodnost pri tretiranih živalih. V nekaterih primerih lahko zadostuje že en sam visok odmerek.

Mejni preskus

Nestrupene snovi je treba preskusiti s 5 g/kilogram pri enem samem odmerku ali z 1 g/kilogram/dan pri ponovljenih odmerkih.

Postopek

Na voljo je nekaj programov tretiranja. Preskusna snov se najpogosteje daje samo enkrat. Uporabijo se lahko tudi drugi programi tretiranja.

Posamezni samci se parijo zaporedno z eno ali dvema netretiranima samicama, ki se še nista parili, v ustreznih časovnih presledkih po tretiranju. Samice je treba pustiti s samci za čas najmanj enega pojatvenega cikla ali dokler se ne zgodi parjenje, kar se ugotovi ob prisotnosti semenčec v vagini ali ob prisotnosti vaginalnega zamaška.

Število parjenj po tretiranju je določeno s programom tretiranja, zagotoviti pa je treba, da se vse faze zarodnih celic po tretiranju vzorčijo.

Samice se žrtvujejo v drugi polovici brejosti, vsebina maternice pa se pregleda, da bi se določilo število mrtvih in živih ugnezditev. Lahko se pregledajo tudi jajčniki, da bi se določilo število *corpora lutea*.

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele, da bi se prikazalo število samcev, število brejih samic in število nebrejih samic. Navesti je treba posamezne rezultate vsakega parjenja, vključno z identiteto vsakega samca in samice. Za vsako samico je treba zabeležiti teden parjenja, velikost odmerka, ki so ga sprejeli samci, pogostost živih ugnezditev in mrtve ugnezditve.

Izračun skupnega dominantnega smrtnega učinka temelji na primerjavi živih ugnezditev na samico v preskusni skupini z živimi ugnezditvami na samico v kontrolni skupini. Analizira se razmerje med mrtvimi in živimi ugnezditvami iz tretirane skupine v primerjavi z enakim razmerjem iz kontrolne skupine, da bi se prikazala izguba po ugnezditvi.

Iz tabel mora biti razvidno, ali podatki navedeni kot zgodnje in pozne smrti. Če je ocenjena izguba pred ugnezditvijo, je treba navesti tudi to. Izgubo pred ugnezditvijo je mogoče izračunati kot razliko med številom *corpora lutea* in številom ugnezditev ali kot zmanjšanje povprečnega števila ugnezditev na maternico v primerjavi s parjenji v kontrolah.

Podatki se ocenijo z ustreznimi statističnimi metodami.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta, sev, starost in masa uporabljenih živali, število živali vsakega spola v preskusni in kontrolni skupini,

— preskusna snov, nosilec, preskusne velikosti odmerka in utemeljitev izbora odmerka, negativne in pozitivne kontrole, podatki o strupenosti,

— program dajanja in tretiranja,

— program parjenja,

— uporabljena metoda za določitev, ali je prišlo do parjenja,

— čas žrtvovanja,

— merila za preštevanje dominantnih letalnih genov,

— razmerje odmerek/odziv, če je primerno,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

CITOGENETSKI PRESKUS NA ZARODNIH SESALSKIH CELICAH *IN VIVO*

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Pričujoči citogenetski preskus *in vivo* odkriva strukturalne kromosomske aberacije v spermatogonijih. Sestavljen je iz analize mitoze spermatogonijev za aberacije kromatidnega in kromosomskega tipa.

Metoda vključuje pripravo testisov sesalcev, ki so bili izpostavljeni preskusnim kemikalijam na ustrezen način in žrtvovani v različnih časovnih presledkih. Živali se pred žrtvovanjem nadalje tretira z inhibitorji delitvenega vretena, kot je kolhicin, da bi se celice akumulirale v metafazi mitoze (C-metafaza). Pripravijo se na zraku posušeni kromosomi, ki se obarvajo in mikroskopsko analizirajo.

Dodatne podatke lahko priskrbi analiza spermatocit v diakinezi-metafazi I za translokacijske multivalente po obdelavi zarodnih celic spermatogonijev.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Preskusne kemikalije se raztopijo v izotonični raztopini soli. Če niso topne, se raztopijo ali suspendirajo v ustreznem nosilcu. Uporabljajo se sveže pripravljene raztopine preskusne spojine. Če je za lažje dajanje odmerkov uporabljen nosilec, le-ta ne sme vplivati na preskusno kemikalijo ali povzročati strupenih učinkov.

Način dajanja

Preskusne spojine naj se na splošno daje le enkrat. Na podlagi toksikoloških podatkov je mogoče uporabiti tudi ponavljajoči program tretiranja. Vendar pa je ponovljeno tretiranje možno uporabiti le, če preskusna spojina ne kaže večjih citotoksičnih učinkov pri diferenciaciji spermatogonijev.

Običajna načina dajanja sta oralni način in intraperitonealna injekcija. Ustrezni so tudi drugi načini dajanja.

Preskusne živali

Najpogosteje se uporabljajo miši in kitajski hrčki. Uporabijo se lahko katere koli druge vrste sesalcev.

Uporabijo se spolno zreli samci in se naključno razporedijo v preskusne in kontrolne skupine.

Število živali

Uporabi se najmanj pet samcev na preskusno in kontrolno skupino.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

V vsak preskus se vključijo sočasne pozitivne in negativne (nosilec) kontrole.

Snovi pozitivne kontrole je treba uporabiti v ustrezno nizkem odmerku (npr. mitomicin C, intraperitonealno, v višini 0,3 mg/kilogram), da bi se dokazala občutljivost preskusa.

Velikosti odmerka

Uporabi se en odmerek preskusne spojine, pri čemer je ta odmerek maksimalni tolerirani odmerek ali pa kaže nekaj znakov citotoksičnosti. Če ta odmerek povzroči visoko uničenje celic, potem je treba uporabiti dodatni nižji odmerek, ki kaže citotoksičnost. Kadar je treba določiti razmerje odmerek/odziv, so zahtevane najmanj tri velikosti odmerka (npr. da bi se potrdil šibak pozitiven odziv). Nestrupene snovi je treba preskusiti pri najvišji izvedljivi velikosti odmerka, pri enkratnem in ponovljenem dajanju.

Postopek

Živali se običajno s preskusno snovjo tretirajo le enkrat. V skupini z najvišjim odmerkom se uporabijo trije časovni presledki vzorčenja po tretiranju. Osrednji časovni presledek vzorčenja je 24 ur. Ker preskusna spojina lahko vpliva na kinetiko celičnega cikla, se izvajata en zgodnji in en poznejši časovni presledek vzorčenja, ki sta primerno razporejena v območju 6 do 48 ur. V primeru dodatnih velikosti odmerkov je treba odvzeti vzorce v še posebej občutljivem časovnem presledku ali, če ta ni znan, 24 ur po tretiranju.

Mogoče pa je izvajati tudi ponavljajoči program tretiranja, pri katerem se živali žrtvujejo 24 ur po zadnjem tretiranju. Uporabijo se lahko tudi dodatna časovna obdobja vzorčenja v območju 6 do 24 ur.

Priprava testisov

Za analizo mitoze spermatogonijev se živalim intraperitonealno vbrizga ustrezen odmerek inhibitorja delitvenega vretena, kot je kolhicin. Živali se nato žrtvujejo v ustreznem časovnem presledku. Pri miših ta časovni presledek variira od treh do petih ur, pri kitajskih hrčkih pa je potrebno več kot pet ur.

Uporablja se tehnika sušenja na zraku. Različne vrste mogoče zahtevajo spremembe standardnega postopka. Dobljene celične suspenzije se obdela s hipotonično raztopino in fiksira. Celice se nanesejo na stekelca in obarvajo. Stekelca se pred mikroskopsko analizo kodirajo.

Analiza

Za strukturalne kromosomske aberacije se analizira najmanj 100 dobro razvitih mitotskih metafaz s celotnim številom centromer. Poleg tega se lahko določi razmerje med mitozami spermatogonijev in prvo in drugo mejotsko metafazo, v vzorcu 100 celic, ki se delijo na žival, da bi se ugotovil možen citotoksičen učinek

2. **PODATKI**

Podatki se povzamejo v obliki tabele. Za vsako kontrolno in preskusno žival se vsi tipi aberacij navedejo ločeno. Vključita se skupno število analiziranih celic in skupno število aberantnih celic na skupino. Za vse parametre se določijo srednje vrednosti in standardni odmik. Če je določeno srednje razmerje med mitozo spermatogonijev ter prvo in drugo mejotsko metafazo, se ga na tabeli prikaže za vsako preskusno in kontrolno skupino.

Podatki se ocenijo z ustreznimi statističnimi metodami.

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vrsta in sev samcev, starost in masa samcev,

— število živali v vsaki preskusni in kontrolni skupini,

— preskusni pogoji, podroben opis tretiranja, velikosti odmerka, topila, uporabljen inhibitor delitvenega vretena,

— število analiziranih celic na žival v vsaki skupini,

— za vsako preskusno in kontrolno žival: tip in število aberacij,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS POJAVA MADEŽEV NA MIŠIH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

To je preskus *in vivo* na miših, pri katerem se kemikalijam izpostavijo razvijajoči embrii. Ciljne celice v razvijajočih embriih so melanoblasti, ciljni geni pa so tisti, ki nadzorujejo pigmentacijo dlak krzna. Razvijajoči se embrii so heterozigotni za številne navedene gene za obarvanje krzna. Posledica mutacije v dominantnem alelu tega gena v melanoblastu ali izgube tega alela (zaradi različnih genetskih vzrokov) se odraža v izražanju recesivnega fenotipa v njegovih celicah potomkah, ki predstavlja madež spremenjene barve na krznu miši. Določi se število zaroda z navedenimi madeži, mutacijami, njihova pogostost pa se primerja s pogostostjo teh madežev med potomci, ki nastanejo iz embriov, tretiranih samo s topilom. Preskus pojava madežev pri miših odkriva predvidene somatske mutacije v fetalnih celicah.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Preskusne snovi se, kadar je mogoče, raztopijo ali suspendirajo v izotonični raztopini soli. Kemikalije, netopne v vodi, se raztopijo ali suspendirajo v ustreznih nosilcih. Uporabljeni nosilec ne sme interferirati s preskusno kemikalijo niti povzročati strupenih učinkov. Uporabiti je treba sveže pripravljene preskusne kemikalije.

Preskusne živali

Miši seva T (nonagouti, a/a; chincilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) se parijo ali s sevom HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe), ali s C57 BL (nonagouti, a/a). Lahko se izvajajo tudi druga ustrezna križanja, kot med NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) in DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d), pod pogojem, da proizvedejo potomce nonagouti.

Število in spol

Tretira se zadostno število brejih samic, da bi se ustvarilo ustrezno število preživelega zaroda pri vsaki uporabljeni velikosti odmerka. Ustrezno velikost vzorca določa število madežev, opaženih na tretirani miši, in lestvica kontrolnih podatkov. Negativni rezultat je sprejemljiv le, če se doseže najmanj 300 potomcev samic, tretiranih z najvišjo velikostjo odmerka.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

Na razpolago morajo biti sočasni kontrolni podatki za miši, ki so bile tretirane samo z nosilcem (negativne kontrole). Da bi se povečala občutljivost preskusa, se lahko uporabijo tudi pretekli kontrolni podatki iz istega laboratorija, pod pogojem da so le-ti homogeni. Če se ne odkrije mutagenosti preskusne kemikalije, naj bi bili na voljo podatki pozitivne kontrole, ki so bili pred kratkim pridobljeni v istem laboratoriju pri tretiranju s kemikalijo, za katero je poznano, da v tem preskusu pokaže mutagenost.

Način dajanja

Običajna načina dajanja sta oralna intubacija ali intraperitonealna injekcija, ki se jo da brejim samicam. Kadar je ustrezno, se lahko uporabi tretiranje z inhalacijo ali kak drug način dajanja.

Velikosti odmerka

Uporabita se najmanj dve velikosti odmerka, vključno z eno, ki kaže znake strupenosti ali zmanjšano velikost zaroda. V primeru nestrupenih kemikalij je treba živali izpostaviti maksimalni izvedljivi velikosti odmerka.

Postopek

Običajno se živali tretirajo enkrat na osmi, deveti ali deseti dan brejosti, pri čemer je prvi dan tisti, ko se prvič opazi vaginalni zamašek. Ti dnevi se ujemajo s 7,25, 8,25 in 9,25 dneva po spočetju. V teh dneh se lahko živali tretirajo tudi zaporedno.

Analiza

Med tretjim in četrtim tednom po skotitvi se potomci kodirajo in preštejejo se madeži. Ločimo tri razrede madežev:

(a) beli madeži v razmaku do 5 mm od srednje trebušne linije, ki so domnevno rezultat uničenja celic (WMVS);

(b) rumeni, agouti madeži okrog seskov, genitalij, vratu, pazdušnega in dimeljskega področja in sredi čela, ki so domnevno rezultat napačne diferenciacije (MDS); in

(c) pigmentirani in beli madeži, naključno razporejeni po krznu, ki so domnevno rezultat somatskih mutacij (RS).

Določijo se vsi trije razredi, vendar je le zadnji, RS, genetsko pomemben. Težave razločevanja med MDS in RS se lahko razrešijo s fluoroscentnim mikroskopiranjem vzorčnih dlak.

Upoštevati je treba očitne vidne morfološke abnormalnosti potomcev.

2. PODATKI

Podatki se predstavijo kot skupno število preštetih potomcev in število potomcev z enim ali več madeži, ki so domnevno rezultat somatskih mutacij. Podatki tretirane skupine in negativne kontrole se primerjajo z ustreznimi metodami. Podatki se navedejo tudi po posameznem zarodu.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— sevi, uporabljeni pri križanju,

— število brejih samic v preskusnih in kontrolnih skupinah,

— povprečna velikost zaroda v preskusnih in kontrolnih skupinah ob skotitvi in pri odstavitvi od sesanja,

— velikost(i) odmerka preskusne kemikalije,

— uporabljeno topilo,

— dan brejosti, ko je bilo opravljeno tretiranje,

— način tretiranja,

— skupno število preštetih potomcev in število potomcev z WMVS, MDS in RS v preskusnih in kontrolnih skupinah,

— vidne morfološke abnormalnosti,

— razmerje odmerek/odziv pri RS, kadar je mogoče,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 **Ocena in razlaga**

Glej Splošni uvod dela B.

4. **VIRI**

Glej Splošni uvod dela B.

PRESKUS DEDNE TRANSLOKACIJE NA MIŠIH

1. METODA

1.1 Uvod

Glej Splošni uvod dela B.

1.2 Opredelitev pojmov

Glej Splošni uvod dela B.

1.3 Referenčne snovi

Jih ni.

1.4 Princip preskusne metode

Preskus dedne translokacije na miših odkriva strukturalne in numerične kromosomske spremembe v zarodnih sesalskih celicah, pridobljenih pri potomcih prve generacije. Tipi odkritih kromosomskih sprememb so recipročne translokacije in, če so vključeni tudi potomci samic, izguba kromosoma X. Nosilci translokacij in samice tipa XO kažejo zmanjšano plodnost, kar se uporabi za izbor potomcev F_1 za citogenetsko analizo. Popolno sterilnost povzročijo nekateri tipi translokacij (avtosom X in tip c-t). Translokacije se citogenetsko opazujejo v mejotičnih celicah v diakinezi-metafazi I posameznih samcev, bodisi samcev F_1 ali zaroda samcev samic F_1. Samice tipa XO se citogenetsko prepozna po prisotnosti samo 39 kromosomov v mitozi kostnega mozga.

1.5 Merila kakovosti

Jih ni.

1.6 Opis preskusne metode

Priprave

Preskusne kemikalije se raztopijo v izotonični raztopini soli. Če so netopne, se raztopijo ali suspendirajo v ustreznem nosilcu. Uporabljajo se sveže pripravljene raztopine preskusne spojine. Če je za lažje dajanje odmerkov uporabljen nosilec, le-ta ne sme vplivati na preskusno kemikalijo ali povzročati strupenih učinkov.

Način dajanja

Načina dajanja sta običajno oralna intubacija in intraperitonealna injekcija. Ustrezni so lahko tudi drugi načini dajanja.

Preskusne živali

Zaradi lažjega vzrejnega in citološkega preverjanja se navedeni preskusi opravljajo na miših. Ne zahteva se nikakršen poseben mišji sev. Vendar pa mora biti povprečna velikost zaroda seva večja od osem in relativno konstantna. Uporabijo se zdrave, spolno zrele živali.

Število živali

Število potrebnih živali je odvisno od frekvence spontane translokacije in minimalne stopnje indukcije, ki je potrebna za pozitiven rezultat.

Preskus se običajno opravlja z analizami potomcev samcev F_1. Preskus je treba opraviti na najmanj 500 potomcih samcih F_1 na skupino odmerka. Če se vključijo potomci samice F_1, je zahtevanih 300 samcev in 300 samic.

Uporaba negativnih in pozitivnih kontrol

Na voljo naj bi bili ustrezni kontrolni podatki, izpeljani iz sočasnih in preteklih kontrol. Kadar so na voljo sprejemljivi rezultati pozitivne kontrole iz preskusov, ki so bili pred kratkim izvajani v istem laboratoriju, se ti rezultati lahko uporabijo namesto tekoče pozitivne kontrole.

Velikosti odmerka

Preskuša se ena velikost odmerka, ponavadi je to najvišji odmerek, povezan s povzročitvijo minimalnih strupenih učinkov, vendar brez vpliva na razmnoževalno vedenje ali preživetje. Da bi se določilo razmerje odmerek/odziv, sta zahtevana še dva dodatna nižja odmerka. V primeru nestrupenih kemikalij je treba živali izpostaviti maksimalni izvedljivi velikosti odmerka.

Postopek

Tretiranje in parjenje

Na voljo sta dva programa tretiranja. Najpogosteje se uporablja enkratno dajanje preskusne snovi. Preskusna snov se lahko daje tudi sedem dni na teden, in sicer 35 dni. Število parjenj po tretiranju je določeno s programom tretiranja, zagotoviti pa je treba, da se vzorčijo vse faze obdelanih zarodnih celic. Po obdobju parjenja se samice posamezno razvrstijo po kletkah. Ko samica skoti mladiče, se zabeleži datum, velikost zaroda in spol potomcev. Vsi moški potomci se odstavijo od sesanja, ženske potomke pa se izločijo, razen če se ne vključijo v preskus.

Preskus translokacijske heterozigotnosti

Uporabljata se ena od dveh možnih metod:

— preskus plodnosti potomcev F_1 in nadaljnje preverjanje možnih nosilcev translokacij s citogenetsko analizo,

— citogenetska analiza vseh potomcev samcev F_1 brez vnaprejšnje selekcije s preskusom plodnosti.

(a) Preskus plodnosti

Zmanjšano plodnost posameznih živali F_1 je mogoče ugotoviti na podlagi opazovanja velikosti zaroda in/ali analize vsebine maternice samic.

Za uporabljeni mišji sev morajo biti določena merila določanja normalne in zmanjšane plodnosti.

Opazovanja velikosti zaroda: samci F_1, ki bodo preskušani, so posamezno razporejeni po kletkah s samicami bodisi iz istega preskusa ali iz kolonije. Kletke se dnevno pregledujejo od 18. dne po parjenju. Ob skotitvi se zabeležita velikost zaroda in spol potomcev F_2, nakar se zarodi izločijo. Če se opravlja preskus na potomcih samicah F_1, se potomce F_2 iz majhnih zarodov ohrani za nadaljnje preskuse. Samice, ki so nosilke translokacij, se preverijo s citogenetsko analizo translokacije pri katerem koli izmed njihovih moških mladičev. Samice tipa XO se prepoznajo po tem, da se razmerje spolov samci-samice med njihovimi potomci spremeni iz 1:1 na 1:2. V naslednjem postopku se normalne živali F_1 izločijo iz nadaljnjih preskusov, če prvi zarod F_2 doseže ali preseže vnaprej določeno normalno vrednost, sicer se opazuje drugi ali tretji zarod F_2.

Živali F_1, ki jih po opazovanju najmanj treh zarodov F_2 ni mogoče razvrstiti kot normalne, se nadaljnje preskušajo z analizo vsebine maternice samic, ki so se parile, ali pa se takoj podvržejo citogenetski analizi.

Analiza vsebine maternice: Zmanjšanje velikosti zaroda nosilcev translokacij je posledica embrionalne smrti, tako da visoko število mrtvih ugnezditev kaže na prisotnost translokacije pri preskusni. Vsakega izmed samcev F_1, na katerih se bo opravljal preskus, se pari z dvema do tremi samicami. Spočetje se ugotovi tako, da se vsak dan zjutraj samice pregledajo za vaginalne zamaške. 14 do 16 dni pozneje se samice žrtvujejo in zabeležijo se žive in mrtve ugnezditve v njihovih maternicah.

(b) Citogenetska analiza

Testisi se pripravijo s tehniko sušenja na zraku. Nosilci translokacij se prepoznajo po prisotnosti multivalentnih konfiguracij v diakinezi metafaze I v primarnih spermatocitah. Zahtevani dokaz, da je žival, na kateri se opravlja preskus, nosilec translokacije, dobimo z opazovanjem najmanj dveh celic z multivalentno asociacijo.

Če ni bila opravljena nikakršna vzrejna selekcija, se na vseh samcih F_1 opravi citogenetski pregled. Pod mikroskopom je treba prešteti najmanj 25 celic diakineze-metafaze I na samca. Pregled mitotičnih metafaz v spermatogonijih kostnega mozga je potreben pri samcih F1 z majhnimi testisi in mejotično členitvijo pred diakinezo ali na samicah za katere se sumi, da so tipa XO. Prisotnost nenavadno dolgega in/ali kratkega kromosoma v vsaki izmed 10 celic je dokaz posebne sterilne translokacije pri samcih (c-t tip). Nekaj translokacij avtosoma X, ki povzročajo sterilnost samcev, se lahko prepozna le z analizo proganja mitotičnih kromosomov. Prisotnost 39 kromosomov v vseh 10 mitozah je dokaz stanja XO pri samici.

2. PODATKI

Podatki se povzamejo v obliki tabele.

Navede se srednja velikost zaroda in razmerje med spoloma iz parjenj staršev ob rojstvu in odstavitvi od sesanja za vsak interval parjenja.

Za oceno plodnosti živali F_1 se prikaže srednja vrednost velikost zaroda vseh normalnih parjenj ter posamezne velikosti zarodov nosilcev translokacij F_1. Za analizo vsebine maternice se navede povprečno število živih in mrtvih vsadkov pri normalnih parjenjih ter posamezna števila živih in mrtvih vsadkov za vsako parjenje nosilcev translokacij F_1.

Za citogenetsko analizo diakineze-metafaze I se pri vsakem nosilcu translokacij navede število tipov multivalentne konfiguracije in skupno število celic.

V primeru posameznih sterilnih živali F_1 se navede skupno število parjenj in trajanje obdobja parjenja. Podajo se teže testisov in podrobnosti citogenetske analize.

V primeru samic tipa XO se navedena srednja velikost zaroda, razmerje po spolu med potomci F_1 in rezultate citogenetske analize.

Kadar se možni nosilci translokacij vnaprej izberejo s preskusi plodnosti, je treba v tabele vključiti podatke o tem, od teh je bilo potrjenih za translokacijske heterozigote.

Poročajo se podatki iz preskusov z negativno in pozitivno kontrolo.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— sev miši, starost živali, masa tretiranih živali,

— število starševskih živali vsakega spola v preskusni in kontrolni skupini,

— preskusni pogoji, podroben opis tretiranja, velikosti odmerka, topila, program parjenja,

— število in spol potomcev na samico, število in spol potomcev, vzrejenih za analizo translokacije,

— čas in merila analize translokacije,

— število in podroben opis nosilcev translokacij, vključno z vzrejnimi podatki in podatki o vsebini maternice, če je primerno,

— citogenetski postopki in podrobnosti mikroskopske analize, po možnosti s slikami,

— statistična ocena,

— obravnava rezultatov,

— razlaga rezultatov.

3.2 Ocena in razlaga

Glej Splošni uvod dela B.

4. VIRI

Glej Splošni uvod dela B.

DEL C: METODE ZA DOLOČANJE STRUPENOSTI ZA OKOLJE

SPLOŠNI UVOD: DEL C

Spodaj opisane preskusne metode so namenjene določitvi nekaterih lastnosti strupenosti za okolje, naštetih v Prilogi VIII k Direktivi Sveta 79/831/EGS. Prijavitelji morajo vedeti, da v besedilo niso vključene metode za določitev naslednjih lastnosti, predvidenih v Stopnji 1 Priloge VIII:

— Podaljšana študija strupenosti z *Daphnia magna*,

— Preskus na višjih rastlinah,

— Podaljšana študija strupenosti na ribah,

— Preskus kopičenja na eni vrsti.

Ko bodo ustrezne preskusne metode za določitev navedenih lastnosti zaključene, bodo objavljene v obliki nadaljnje prilagoditve tehničnemu napredku. V vmesnem obdobju naj prijavitelji uporabljajo ustrezne, mednarodno priznane metode, ki jih je treba predstaviti pristojnim organom.

PRESKUS ZAVIRANJA RASTI ALG

1. METODA

1.1 Uvod

Namen tega preskusa je določiti učinke snovi na rast vrste enoceličnih zelenih alg. Z relativno kratkimi preskusi je mogoče oceniti učinke na več generacijah. To metodo se lahko prilagodi za uporabo na več vrstah enoceličnih alg, v tem primeru pa se mora ob poročilu o preskusu podati tudi opis uporabljene metode.

Navedeno metodo se najlažje uporabi z vodotopnimi snovmi, ki bodo v določenih preskusnih pogojih najverjetneje ostale v vodi.

Kvantitativna določitev EC_{50} (glej Opredelitve pojmov spodaj) v primeru snovi z omejeno topnostjo v preskusnem mediju verjetno ne bo mogoča.

Navedena metoda se lahko uporabi pri snoveh, ki ne interferirajo neposredno z meritvami rasti alg.

Pri izvajanju navedenega preskusa so lahko v pomoč naslednji podatki:

— topnost v vodi,

— parni tlak,

— strukturna formula,

— čistost snovi,

— kemijska stabilnost v vodi in na svetlobi,

— analitične metode količinske opredelitve snovi v vodi,

— vrednost pK_a,

— porazdelitveni koeficient n-oktanol/voda.

— rezultati preskusa hitre biorazgradljivosti.

1.2 Opredelitve pojmov in enote

Koncentracija celic: število celic na mililiter;

Rast: povečanje koncentracije celic tekom preskusnega obdobja;

Stopnja rasti: povečanje koncentracije celic na časovno enoto;

EC_{50}: v tej metodi koncentracija preskusne snovi, ki povzroči 50 % zmanjšanje bodisi rasti bodisi stopnje rasti, v primerjavi s kontrolo;

NOEC (koncentracija brez opaznega učinka): v tej metodi najvišja preskušena koncentracija, pri kateri parameter ali parametri ne pokažejo nobenega posebnega zaviranja rasti, v primerjavi s kontrolnimi vrednostmi;

1.3 Referenčne snovi

Preskušanje referenčnih snovi je lahko način odkrivanja nezadovoljivih preskusnih pogojev. Če se uporabi referenčna snov, je treba rezultate podati v poročilu o preskusu. Kot referenčna snov se lahko uporabi kalijev dikromat.

1.4 Princip preskusne metode

Kulture izbranih zelenih alg v eksponentni rasti se pod opredeljenimi pogoji v več generacijah izpostavijo različnim koncentracijam preskusne snovi. Zaviranje rasti v zvezi s kontrolno kulturo se določi v točno določenem obdobju.

1.5 **Merila kakovosti**

1.5.1 *Pogoji za veljavnost preskusa*

Koncentracija celic v kontrolnih kulturah se mora v treh dneh povečati za najmanj faktor 16.

Izginotje preskusne snovi iz vode zaradi prenosa v biomaso ne pomeni nujno razveljavitve preskusa.

1.6 **Opis preskusnega postopka**

1.6.1 *Priprava*

1.6.1.1 Oprema in materiali

— Običajna laboratorijska oprema,

— Preskusne posode ustrezne prostornine (npr. 250 ml erlenmajerice ustrezajo za 100 ml preskusne raztopine),

— Naprava za gojenje: kabinet ali komora, v kateri je mogoče ohranjati temperaturo od 21 do 25 ± 2 °C ter omogočiti neprekinjeno enakomerno osvetljenost v spektralnem območju od 400 do 700 nm. (Priporoča se kvantni fluks 0,72 x 10^{20} fotonov/m^2s znotraj ± 20 %. Ta kvantni fluks je enak 120 µm/m^2s in se lahko doseže z univerzalnimi belimi fluorescentnimi svetilkami (svetloba-temperatura približno 4 200 K), ki proizvajajo približno 8 000 luksov, merjeno s sferičnim kolektorjem.)

— Naprava za določanje koncentracije celic, npr. elektronski števec delcev, mikroskop s komoro za štetje, fluorimeter, spektrofotometer, kolorimeter (*Opomba:* da bi dobili uporabne meritve pri nizkih koncentracijah celic z uporabo spektrofotometra, bo mogoče potrebna uporaba kivet z dolžino optične poti najmanj 4 cm).

1.6.1.2 Gojišče za alge

Priporoča se naslednje gojišče:

NH_4Cl:	15	mg/l
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$:	12	mg/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$:	18	mg/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$:	15	mg/l
KH_2PO_4:	1,6	mg/l
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$:	0,08	mg/l
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$:	0,1	mg/l
H_3BO_3	0,185	mg/l
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$:	0,415	mg/l
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$:	$1,5 \times 10^{-3}$	mg/l
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$:	10_5^-	mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l
$NaHCO_3$:	50	mg/l

pH tega gojišča je po izenačitvi z zrakom približno 8.

Zgoraj navedeno priporočilo ne izključuje uporabe drugega gojišča, vendar pod pogojem, da se upoštevajo naslednje omejitve bistvenih sestavin:

P:	≤ 0,7 $mg \cdot l^{-1}$
N:	≤ 10 $mg \cdot l^{-1}$
helatorji:	≤ 10^{-3} $mmol \cdot l^{-1}$
trdota (Ca + Mg):	≤ 0,6 $mmol \cdot l^{-1}$

Priporočeno gojišče in gojišče, podano v viru (1), ustrezata tej zahtevi.

1.6.1.3 Preskusni organizmi

Izbor vrst

Predlaga se uporaba hitro rastoče vrste zelenih alg, ki je primerna za gojenje in preskušanje. Za ustrezne veljajo naslednje vrste:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86,81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Če so uporabljene druge vrste, je treba navesti sev.

1.6.1.4 Zasnova preskusa

Začetna koncentracija celic

Priporočljiva začetna koncentracija celic v preskusnih kulturah naj bo približno 10^4 celic/ml za *Selenastrum capricornutum* in *Scenedesmus subspicatus*. Kadar so uporabljene druge vrste, mora biti biomasa primerljiva.

Koncentracija preskusne snovi

Razpon koncentracije, znotraj katerega bo najverjetneje prišlo do učinkov, se določi na podlagi rezultatov preskusa za ugotavljanje območja. Za ta test je treba izbrati najmanj pet koncentracij, razporejenih v geometrijskem zaporedju. Najnižja preskusna koncentracija ne bi smela imeti nikakršnega opaznega učinka na rast alg. Najvišja preskusna koncentracija naj bi zavrla rast za najmanj 50 %v primerjavi s kontrolo ali, po možnosti rast popolnoma zaustavila.

Dvojniki in kontrole

V zasnovo preskusa naj se po možnosti vključijo trije dvojniki za vsako preskusno koncentracijo ter v najboljšem primeru dvakrat toliko kontrol. Če je utemeljeno, je mogoče zasnovo preskusa spremeniti, da bi se povečalo število koncentracij in zmanjšalo število dvojnikov na koncentracijo.

Kadar je za pospeševanje raztapljanja preskusne snovi uporabljen nosilec, je treba v zasnovo preskusa vključiti še dodatne kontrole, ki vsebujejo nosilec pri najvišjih uporabljenih koncentracijah.

1.6.2 *Izvajanje preskusa*

Ta oddelek vsebuje navodila za preskušanje lahko in slabo topnih ter hlapnih snovi.

1.6.2.1 Preskušanje lahko vodotopnih snovi

Preskusne kulture, ki vsebujejo želene koncentracije preskusne snovi in želeno količino inokuluma alg, se pripravijo z redčenjem s filtriranim gojiščem alg, alikvoti osnovnih raztopin preskusne snovi in suspenzijo alg.

Posode s kulturami se pretresejo in postavijo v napravo za gojenje. Med preskusom je treba alge ohranjati v suspenziji in omogočiti prenos CO_2. V ta namen se lahko uporabi tresenje, mešanje ali prezračevanje. Kulture je treba vzdrževati na temperaturi od 21 do 25 °C, pod nadzorom do ± 2 °C.

Koncentracija celic v vsaki posodi se določi najmanj 24, 48 in 72 ur po začetku preskusa. Filtrirano gojišče alg se uporabi za določitev ozadja pri uporabi števcev delcev, ali kot negativno kontrolo pri uporabi spektrofotometrov.

pH se izmeri na začetku preskusa in po 72 urah.

pH raztopine v normalnih pogojih med preskusom ne bi smel odstopati za več kot eno enoto.

1.6.2.2 Preskušanje snovi z omejeno vodotopnostjo

Kadar je topnost preskusne snovi istega reda kot najvišja koncentracija, ki je uporabljena v preskusu, so potrebna le rahla odstopanja od zgoraj navedenega postopka, da bi se naredile preskusne raztopine. Nasičena raztopina lahko služi kot osnovne raztopine preskusne snovi. Drugi pristop je lahko ta, da se preskusna snov raztopi pri želeni koncentraciji v gojišču alg še pred dajanjem suspenzije alg.

Osnovne raztopine snovi nizke vodotopnosti se lahko pripravijo z mehanično disperzijo ali z uporabo nosilcev nizke strupenosti na alge, kot so organska topila, emulgatorji ali razpršil. Kadar je uporabljen nosilec, koncentracija ne sme preseči 100 mg/liter, v zasnovo preskusa pa morajo biti vključene dodatne kontrole, pri katerih se nosilec združi z najvišjo koncentracijo, prisotno v preskusni snovi.

1.6.2.3 Preskušanje hlapnih snovi

Splošno sprejetega načina preskušanja hlapnih snovi še ni. Kadar je znano, da je snov nagnjena k izhlapevanju, se lahko uporabijo zaprte preskusne posode s povečanim aom nad preskusnim medijem. Predlagani so tudi drugi načini te metode (glej vir (1)).

Poskušati je treba določiti količino snovi, ki ostane v raztopini, potrebna pa je tudi skrajna previdnost pri razlagi rezultatov preskusa s hlapnimi kemikalijami, kadar se uporabljajo zaprti sistemi.

2. PODATKI IN OCENA

Izmerjene koncentracije celic v preskusnih kulturah in kontrolah se prikažejo v tabeli skupaj s koncentracijami preskusne snovi in časom merjenja. Srednja vrednost koncentracije celic za vsako koncentracijo preskusne snovi in za kontrole se prikaže v odvisnosti od časa, da bi se dobile rastne krivulje.

Za določitev razmerja koncentracija/učinek je treba uporabiti naslednja pristopa.

2.1 **Primerjava površin pod rastnimi krivuljami**

Površine pod rastnimi krivuljami se lahko izračuna z naslednjo formulo:

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

pri čemer je:

A = površina

N_0 = nominalno število celic/ml v času t_0,

N_1 = izmerjeno število celic/ml v t_1,

N_n = izmerjeno število celic/ml v t_n,

t_1 = čas prve meritve po začetku preskusa,

t_n = čas n-te meritve po začetku preskusa.

Odstotek zaviranja rasti celic se za vsako koncentracijo preskusne snovi (I_A) izračuna kot razlika med pod rastno krivuljo kontrole (A_C) in površino pod rastno krivuljo pri vsaki koncentraciji preskusne snovi (A_t) kot:

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

I_A vrednosti z ustreznimi koncentracijami ponazorimo na semilogaritemskem grafu ali na semilogaritemskem probit grafu. Če so na prikazu na probit grafu točke s prostim očesom razporejene v obliki premice, se zariše premico ali, kadar se lahko sklepa na log-normalno porazdelitev točk, predstavlja izrisana premica oceno regresijske premice.

Vrednost EC_{50} predstavlja presečišče med (regresijsko) premico in vzporednico abscisi pri I_A = 50 %. V primeru izračuna vrednosti EC50 po tej metodi je predlagana oznaka E_bC_{50}. Pri navedeni metodi, kadar se natančno določijo meritve pri 24, 48 in 72 urah, to označimo z E_bC_{50} (0-72 h).

Druge vrednosti EC, kot je E_bC_{10}, se lahko tudi prebere iz grafa I_A *versus* log koncentracije.

2.2 **Primerjava stopenj rasti**

Povprečna specifična stopnja rasti (μ) za kulture eksponentne rasti se izračuna z

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

Po drugi strani je povprečno specifično rast mogoče izpeljati tudi iz nagiba regresijske premice na prikazu ln N proti času.

Odstotek zmanjšanja povprečne specifične stopnje rasti pri vsaki koncentraciji preskusne snovi v primerjavi s kontrolno vrednostjo se prikaže v odvisnosti od logaritma koncentracije. Iz dobljenega grafičnega prikaza je mogoče razbrati njihov EC_{50}. Da bi jasno označili EC_{50}, izpeljan s to metodo, je priporočljivo uporabiti simbol E_rC_{50}. Označiti je treba čase meritev, npr. ali se vrednost nanaša na čase opazovanja pri 24 in 48 urah, pri čemer simbol postane E_rC_{50} (24–48 ur).

Opomba: specifična stopnja rasti je logaritemska vrednost in majhne spremembe v stopnji rasti lahko pripeljejo do velikih sprememb v biomasi. Vrednosti E_bC in E_rC zato numerično niso primerljive.

3. **POROČILO**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— Preskusna snov: identifikacijski podatki o kemikaliji,

— Preskusni organizmi: izvor, laboratorijska kultura, številka seva, metoda gojenja,

— Preskusni pogoji:

  — datum začetka in konca preskusa ter njegovo trajanje,

  — temperatura,

  — sestava gojišča,

— naprava za gojenje,

— pH raztopin na začetku in koncu preskusa (če so opažena odstopanja v pH za več kot eno enoto, je treba to obrazložiti),

— nosilec in uporabljena metoda za pospeševanje raztapljanja preskusne snovi in koncentracije nosilca v preskusnih raztopinah,

— svetilnost in kakovost,

— preskušene koncentracije (merjene ali nominalne).

— Rezultati:

— koncentracija celic za vsako posodo pri vsaki točki merjenja in metoda merjenja koncentracije celic,

— srednje vrednosti koncentracije celic,

— rastne krivulje,

— grafični prikaz odnosa koncentracija/učinek,

— vrednosti EC in metoda izračuna,

— NOEC,

— drugi opaženi učinki.

4. **VIRI**

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

(2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung de Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“, v: Rudolph/Boje: *Ökotoxicologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Dodatek

PRIMER POSTOPKA GOJENJA ALG

Splošna opažanja

Namen gojenja po naslednjem postopku je pridobitev kulture alg za preskuse strupenosti.

Uporabiti je treba ustrezne metode za zagotovitev, da kulture alg niso okužene z bakterijami (ISO 4833). Zaželene so lahko aksenične kulture, vendar je bistveno, da so kulture iz ene same vrste alg.

Vse postopke je treba opraviti v sterilnih pogojih, da bi se izognili okužbi z bakterijami in drugimi algami.

Oprema in materiali

Glej točko 1.6.1: Priprave in preskusni organizmi.

Postopki za pridobivanje kultur alg

Priprava hranilnih raztopin (gojišče)

Vse hranilne soli gojišča se pripravijo kot koncentrirane osnovne raztopine in se shranijo v temnem in hladnem prostoru. Navedene raztopine se sterilizirajo s filtriranjem ali avtoklaviranjem.

Gojišče se pripravi z dodajanjem primernih količin osnovnih raztopin sterilni destilirani vodi, pri čemer je treba paziti, da ne pride do okužbe. Za trdno gojišče se doda 0,8 % agarja.

Osnovna kultura

Osnovne kulture so majhne kulture alg, ki se jih redno prenaša na sveže gojišče, da bi tam delovale kot začetni preskusni material. Če se kulture ne uporabljajo redno, se nacepijo v epruvete z nagnjenim agarjem. Te se prenašajo na sveže gojišče najmanj enkrat na dva meseca.

Osnovne kulture rastejo v erlenmajericah z ustreznim gojiščem (količina približno 100 ml). Kadar se alge inkubirajo pri 20 °C z neprekinjeno osvetlitvijo, se zahteva tedenski prenos.

Med prenosom se s sterilnimi pipetami v bučko s svežim medijem prenese določena količina „stare“ kulture, tako da je pri hitro rastočih vrstah začetna koncentracija približno 100 krat manjša od koncentracije v stari kulturi.

Stopnja rasti vrste se določi s pomočjo rastne krivulje. Če je ta znana, je mogoče oceniti gostoto, pri kateri je treba kulturo prenesti na novo gojišče. To je treba storiti še preden kultura doseže smrtno fazo.

Predkultura

Predkultura je namenjena za določanje količine alg, ustrezne za inokulacijo preskusnih kultur. Predkultura se inkubira pod preskusnimi pogoji in uporabi, ko je še v eksponentni fazi rasti, ponavadi po inkubacijskem obdobju približno treh dni. Kadar kulture alg vsebujejo deformirane ali abnormalne celice, je treba le-te izločiti.

STRUPENOST ZA DEŽEVNIKE

PRESKUS NA UMETNIH TLEH

1. METODA

1.1 Uvod

Pri tem laboratorijskem preskusu se preskusna snov doda umetnim tlem, v katera se dajo deževniki za 14 dni. Po tem obdobju (in poljubno po sedmih dneh), se pregleda smrtni učinek snovi na deževnike. Preskus ponuja metodo za relativno kratkotrajen pregled učinkov kemikalij na deževnike, po vnosu preko kože ali hrane.

1.2 Opredelitev pojmov in enota

LC_{50}: Koncentracija snovi, za katero se ocenjuje, da v preskusnem obdobju ubije 50 % preskusnih živali

1.3 Referenčna snov

Referenčna snov se uporablja v rednih časovnih presledkih da se prikaže, da se občutljivost preskusnega sistema ni bistveno spremenila.

Kot referenčna snov se priporoča analitsko čisti kloroacetamid.

1.4 Princip preskusa

Tla so spremenljiv medij, zato je treba za ta preskus uporabiti natančno opredeljena umetna ilovnata tla. Odrasli deževniki vrste *Eisenia foetida* (glej opozorilo v Dodatku) se hranijo v opredeljenih umetnih tleh tretiranih z različnimi koncentracijami preskusne snovi. Vsebina posod se raztrese na pladenj 14 dni (ali sedem dni) po začetku preskusa ter se preštejejo preživeli deževniki pri vsaki koncentraciji.

1.5 Merila kakovosti

Preskus je zasnovan tako, da je kolikor je mogoče, ponovljiv glede na preskusni substrat in organizem. Smrtnost v kontrolah na koncu preskusa ne sme presegati 10 %, sicer je preskus neveljaven.

1.6 Opis preskusne metode

1.6.1 *Materiali*

1.6.1.1 Preskusni substrat

Kot osnovni preskusni substrat se uporabljajo opredeljena umetna tla.

(a) Osnovni substrat (odstotki veljajo za suho maso)

— 10 % šotnega maha (čim bližje pH 5,5 do 6,0 brez kakršnih koli vidnih ostankov rastlin in fino zmlet),

— 20 % gline kaolinit, po možnosti z več kot 50 % kaolinita,

— Približno 69 % industrijskega kremenovega peska (prevladujoči fini pesek z več kot 50 % delcev velikosti 0,05 do 0,2 mm). Če se snov v vodi ne dovolj dispergira, je treba imeti na voljo 10 g tega peska na preskusno posodo za poznejše mešanje s preskusno snovjo,

— Približno 1 % kalcijevega karbonata ($CaCO_3$), zdrobljenega v prah, kemijsko čistega, ki se ga doda, za zvišanje pH na 6,0 ± 0,5.

(b) Preskusni substrat

Preskusni substrat vsebuje osnovni substrat, preskusno snov in deionizirano vodo.

Vsebnost vode je od 25 do 42 % suhe teže osnovnega substrata. Vsebnost vode v substratu se določi z izsušitvijo vzorca do konstantne teže pri 105 °C. Glavno merilo je, da se umetna tla vlaži do točke, dokler ni stoječe vode. Paziti je treba, da se z mešanjem ustvari enakomerna porazdelitev preskusne snovi in substrata. Poročati je treba o načinu vnosa preskusne snovi v substrat.

(c) Kontrolni substrat

Kontrolni substrat vsebuje osnovni substrat in vodo. Če je uporabljeno dodatno sredstvo, mora dodatna kontrola vsebovati enako količino tega dodatnega sredstva.

1.6.1.2 Preskusne posode

Steklene posode prostornine približno enega litra (ustrezno pokrite s plastičnimi pokrovi, posodami ali plastičnim filmom z luknjami za prezračevanje), napolnjeni s količino vlažnega preskusnega ali kontrolnega substrata, ki ustreza 500 g substrata suhe teže.

1.6.2 *Preskusni pogoji*

Posode je treba hraniti v klimatskih komorah pri temperaturi 20 ± 2 °C in pod stalno svetlobo. Jakost svetlobe naj bo 400 do 800 luksov.

Preskusno obdobje traja 14 dni, smrtnost pa je mogoče oceniti tudi sedem dni po začetku preskusa.

1.6.3 *Preskusni postopek*

Preskusne koncentracije

Koncentracije preskusne snovi se izrazijo kot masa snovi na suho maso osnovnega substrata (mg/kg).

Preskus za ugotavljanje območja

Razpon koncentracij, ki povzročajo smrtnost od 0 do 100 % se lahko določi s preskusom za ugotavljanje območja, da bi dobili podatke o razponu koncentracij, ki naj bi se jih uporabilo v končnem preskusu.

Snovi je treba preskusiti pri naslednjih koncentracijah: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg snovi/kilogram preskusnega substrata (suha masa).

Če naj se opravi popoln končni preskus, lahko za preskus za ugotavljanje območja zadostuje že ena preskusna serija na koncentracijo in ena za netretirano kontrolo, pri čemer vsebuje vsaka 10 deževnikov.

Končni preskus

Rezultati preskusa za ugotavljanje območja se uporabijo, za izbor najmanj petih koncentracij v geometrijskem zaporedju, ki povzročijo smrtnost od 0 do 100 % in se ločijo med sabo za konstanten faktor, ki ni večji od 1,8.

Preskusi, pri katerih se uporablja navedena zaporedja koncentracij, naj bi omogočili čimbolj natančno določitev vrednost LC_{50} in njenih mej zaupanja.

V končnem preskusu se uporabijo najmanj štiri preskusne serije na koncentracijo in štiri netretirane kontrole, pri čemer ima vsaka po 10 deževnikov. Rezultati teh ponovitvenih serij se kažejo kot povprečje in standardna deviacija.

Kadar dve zaporedni koncentraciji v razmerju 1,8 povzročita le 0 % in 100 % smrtnost, ti dve vrednosti zadostujeta za določitev razpona, znotraj katerega leži LC_{50}.

Mešanica osnovnega preskusnega substrata in preskusne snovi

Preskusni substrat naj bo, kadar je mogoče, pripravljen brez dodajanja dodatnih sredstev, razen vode. Tik pred začetkom preskusa se emulzija ali disperzija preskusne snovi v deionizirani vodi ali drugem topilu zmeša z osnovnim preskusnim substratom ali pa se enakomerno razprši s finim kromatografskim ali drugim podobnim razpršilom.

Če preskusna snov v vodi ni topna, se lahko raztopi v čim manjši količini ustreznega organskega topila (npr. heksan, aceton ali kloroform).

Za raztapljanje, razpršitev ali emulgiranje preskusne snovi se lahko uporabijo samo tista sredstva, ki hitro izhlapijo. Preskusni substrat je treba pred uporabo prezračiti. Količino izparele vode je treba nadoknaditi. Kontrola mora vsebovati enako količino vsakega dodatnega sredstva.

Če preskusne snovi ni mogoče raztopiti, razpršiti ali emulgirati v organskih topilih, se 10 g mešanice fino zdrobljenega kremenovega peska in količine preskusne snovi, ki je potrebna za tretiranje 500 g suhe teže umetnih tal, zmeša s 490 g suhe teže preskusnega substrata.

Za vsako preskusno serijo se količina vlažnega preskusnega substrata, ki ustreza 500 g suhe teže, postavi v steklene posode, na preskusni substrat pa se položi 10 deževnikov, ki so bili 24 ur kondicionirani v podobnem vlažnem osnovnem substratu, nato pa hitro oprani in posušeni s pomočjo v filtrirnega papirja.

Posode se pokrijejo s preluknjanimi plastičnimi pokrovi, posodami ali filmom, da se prepreči izsuševanje substrata, nakar se jih za 14 dni izpostavi preskusnim pogojem.

Ocene je treba opraviti 14 dni (ali sedem dni) po začetku preskusa. Substrat se raztrese na ploščo iz stekla ali nerjavečega jekla. Pregledajo se deževniki in določi se število preživelih deževnikov. Deževniki veljajo za mrtve, če se ne odzivajo na nežni mehanični stimulus na sprednjem koncu.

Kadar se pregled opravi po sedmih dneh, se posode ponovno napolnijo s substratom, preživeli deževniki pa se ponovno položijo na isti preskusni substrat.

1.6.4 *Preskusni organizmi*

Preskusni organizmi naj bodo odrasli osebki vrste *Eisenia foetida* (glej opozorilo v Dodatku) (stari najmanj dva meseca in s klitelumom) 300 do 600 mg mokre teže. (Za metodo razmnoževanja glej Dodatek).

2. PODATKI

2.1 Obdelava in ocena rezultatov

Koncentracije snovi se poročajo z navedbo ustreznih odstotkov mrtvih deževnikov.

Kadar so podatki ustrezni, je treba vrednost LC_{50} in meje zaupanja (p = 0,05) določiti z uporabo standardnih metod (Litchfield in Wilcoxon, 1949, za ustrezno metodo). LC_{50} je treba podati kot mg preskusne snovi na kilogram preskusnega substrata (suha masa).

V tistih primerih, kjer je nagib krivulje koncentracij prestrm, da bi omogočal izračun LC_{50}, zadostuje že grafična določitev te vrednosti.

Kadar dve zaporedni koncentraciji v razmerju 1,8 povzročita le 0 % in 100 % smrtnost, ti dve vrednosti zadostujeta za določitev razpona, znotraj katerega leži LC_{50}.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— izjava, da je bil preskus opravljen v skladu z zgoraj navedenimi merili kakovosti,

— opravljeni preskus (preskus za ugotavljanje območja in/ali končni preskus),

— natančen opis preskusnih pogojev ali izjava, da je bil preskus opravljen v skladu z metodo; poročati je treba o vseh morebitnih odstopanj;

— natančen opis, kako se je preskusno snov vmešalo v osnovni preskusni substrat,

— podatki o preskusnih organizmih (vrsta, starost, srednja vrednost in razpon v teži, pogoji vzdrževanja in razmnoževanja, dobavitelj),

— uporabljena metoda za določitev LC_{50},

— rezultati preskusa vključno z vsemi uporabljenimi podatki,

— opis opaženih simptomov ali vedenjskih sprememb pri preskusnih organizmih,

— smrtnost v kontrolah,

— LC_{50} ali najvišja preskusna koncentracija brez smrtnosti in najnižja preskusna koncentracija s 100 % smrtnostjo, 14 dni (ali sedem dni) po začetku preskusa,

— prikaz krivulje koncentracija/odziv,

— rezultati, dobljeni s preskusno snovjo, bodisi v povezavi s dotičnim preskusom bodisi iz predhodnih preskusov kontrole kakovosti.

4. VIRI

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

(2) Edwards, C. A. in Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, London, 331 str.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 str.

(4) Litchfield, J. T. in Wilcoxon, F. A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.,* zv. 96, 1949, 99 str.

(5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbunden/Biologische Bundesanstalt für Land- un Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden", v: Rudolph/Boje, *Ökotoxologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

Dodatek

Razmnoževanje in vzdrževanje deževnikov pred preskusom

Za namen razmnoževanja se 30 do 50 odraslih deževnikov postavi v škatlo za razmnoževanje s svežim substratom in se odstrani po 14. dneh. Te živali se lahko uporabijo za nadaljnje razmnoževalne serije. Deževniki, ki se izležejo iz kokonov se, ko so zreli, uporabijo za preskušanje (pod predpisanimi pogoji po dveh ali treh mesecih).

Pogoji vzdrževanja in razmnoževanja

Klimatska komora:	temperatura 20 ± 2 °C, po možnosti pod stalno svetlobo (jakost svetlobe 400 do 800 luksov).
Škatle za razmnoževanje:	ustrezne plitve posode prostornine 10 do 20 l.
Substrat:	Vrsta *Eisenia foetida* se lahko razmnožuje v različnih živalskih iztrebkih. Kot razmnoževalni medij je priporočljiva uporaba mešanice, ki jo do 50 % po prostornini sestavlja šota, 50 % pa kravji ali konjski gnoj. pH vrednost medija mora biti 6 do 7 (uravnavano s kalcijevim karbonatom) in z nizko ionsko prevodnostjo (manj kot 6 mmho ali 0,5 % koncentracije soli). Substrat mora biti vlažen, vendar ne preveč moker. Poleg zgoraj navedene metode je mogoče uporabiti tudi druge uspešne postopke.

Opomba: Eisenia foetida obstaja v dveh rasah, ki so ju nekateri taksonomi ločili v vrste (Bouche, 1972). Te so morfološko podobne, vendar so za vrsto *Eisenia foetida foetida* značilne prečne črte ali obroči na nekaterih predelih, medtem ko druga, *Eisenia foetida andrei*, tega nima in je bolj pisane rdečkaste barve. Kadar je mogoče, je treba uporabiti vrsto *Eisenia foetida andrei*. Drugo vrsto je mogoče uporabiti, če je na voljo potrebna metodologija.

BIORAZGRADNJA

ZAHN – WELLENSOV PRESKUS

1. **METODA**

1.1 **Uvod**

Namen te metode je ocena možne končne biorazgradljivosti vodotopnih, nehlapljivih organskih snovi, ko so v statičnem preskusu izpostavljene relativno visokim koncentracijam mikroorganizmom.

Pri tem lahko pride do fizikalno-kemijske adsorbcije na suspendiranih trdnih delcih, kar je treba upoštevati pri razlagi rezultatov (glej 3.2).

Snovi, ki se bodo preučevale, se uporabijo v koncentracijah, ki ustrezajo vrednostim DOC v razponu od 50 do 400 mg/liter, ali vrednostim KPK v razponu od 100 do 1 000 mg/liter (DOC = raztopljeni organski ogljik; KPK = kemijska potreba po kisiku). Prednost teh relativno visokih koncentracij je analitska zanesljivost. Spojine s strupenimi lastnostmi lahko odložijo ali zavrejo proces razgradnje.

Pri tej metodi se merjenje koncentracije raztopljenega organskega ogljika ali kemijske potrebe po kisiku uporablja za oceno končne biorazgradljivosti preskusne snovi.

Istočasna uporaba specifične analitske metode lahko omogoči oceno primarne biorazgradnje snovi (izginotje matične kemijske strukture).

Metoda se uporablja le za tiste organske preskusne snovi, ki pri koncentraciji, uporabljeni v preskusu:

— so topne v vodi pod preskusnimi pogoji,

— imajo zanemarljiv parni tlak pod preskusnimi pogoji,

— ne zavirajo bakterij,

— se v preskusnem sistemu adsorbirajo le v omejenih razsežnostih,

— se ne izgubijo iz preskusne raztopine s penjenjem.

Podatki o relativnih deležih glavnih sestavin preskusnega materiala bodo uporabni pri razlagi dobljenih rezultatov, zlasti v primerih, kadar so ti rezultati nizki ali zanemarljivi.

Podatki o strupenosti snovi za mikroorganizme so zaželeni pri razlagi nizkih rezultatov in pri izbiranju ustreznih preskusnih koncentracij.

1.2 **Opredelitve pojmov in enote**

Obseg razgradljivosti, dosežen na koncu preskusa, se navede kot „Biorazgradljivost v Zahn – Wellensovem preskusu“:

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

pri čemer je:

D_T = biorazgradnja (%) v času T,

C_A = vrednosti DOC (ali KPK) v preskusni mešanici, izmerjene tri ure po začetku preskusa (mg/l) (DOC = raztopljeni organski ogljik, KPK = kemijska potreba po kisiku),

C_T = vrednosti DOC ali KPK v preskusni mešanici v času vzorčenja (mg/l),

C_B = vrednosti DOC ali KPK negativne kontrole v času vzorčenja (mg/l),

C_{BA} = vrednosti DOC ali KPK negativne kontrole, izmerjene tri ure po začetku preskusa (mg/l).

Obseg razgradljivosti se zaokroži na najbližji celi odstotek.

Odstotek razgradnje se navede kot odstotek odstranitve DOC (ali KPK) preskusne snovi.

Razlika med izmerjeno vrednostjo po treh urah in izračunano ali, po možnosti, izmerjeno začetno vrednostjo lahko da uporabne podatke o odstranitvi snovi (glej 3.2, Razlaga rezultatov).

1.3 **Referenčne snovi**

V nekaterih primerih, kadar se preiskujejo nove snovi, so referenčne snovi lahko uporabne; vendar pa posebej določene referenčne snovi še ni mogoče priporočiti.

1.4 **Princip preskusne metode**

V eno do štiri litrsko stekleno posodo opremljeno s mešalom in prezračevalom se skupaj vnese aktivno blato, mineralne hranilne snovi in preskusni material kot edini vir ogljika v vodni raztopini. Zmes se meša in prezračuje pri 20 do 25 °C pod razpršeno svetlobo ali v temnem prostoru do 28 dni. Potek razgradnje se spremlja z določanjem vrednosti DOC (ali KPK) v filtrirani raztopini dnevno ali v drugih ustreznih rednih časovnih presledkih. Razmerje med izločenim DOC (ali KPK) po vsakem časovnem presledku in vrednostjo tri ure po začetku, se prikaže kot odstotek biorazgradnje in služi kot merilo obsega razgradnje v tem času. Rezultat se prikaže v odvisnosti od časa, da se dobi krivulja biorazgradnje.

Kadar je uporabljena specifična analitska metoda, se lahko izmerijo spremembe v koncentraciji matične molekule, ki so posledica biorazgradnje (primarna biorazgradljivost).

1.5 **Merila kakovosti**

Ponovljivost tega preskusa je bila dokazana v krožnem preskusu.

Občutljivost metode se na splošno določi s spremenljivostjo negativne kontrole in, v manjši meri, z natančnostjo s katero je mogoče določiti raztopljen organski ogljik in količino preskusne spojine v raztopini.

1.6 **Opis preskusnega postopka**

1.6.1 *Priprave*

1.6.1.1 Reagenti

Preskusna voda: pitna voda z vsebnostjo organskega ogljika < 5 mg/liter. Skupna koncentracija ionov kalcija in magnezija ne sme presegati 2,7 mmol/liter, sicer je potrebno ustrezno razredčenje z deionizirano ali destilirano vodo.

Žveplena kislina, analitski reagent (A.R.):	50 $g \cdot l^{-1}$
Raztopina natrijevega hidroksida A.R.:	40 $g \cdot l^{-1}$
Mineralna hranilna raztopina: raztopiti v enem litru deionizirane vode:	
amonijev klorid, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g
natrijev dihidrogenfosfat, $NaH_2PO_4.2H2O$, A.R.:	33,4 g
kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g
dikalijev monohidrogenfosfat, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g

Zmes služi kot hranilni in pufrski sistem.

1.6.1.2 Naprave

Steklene posode s prostornino od enega do štirih litrov (npr. cilindrične posode).

Mešalec s steklenim ali kovinskim mešalom na primerni ročici (mešalec naj rotira približno 5 do 10 cm nad dnom posode). Namesto tega se lahko uporabi magnetno mešalo s 7 do 10 cm dolgim telesom.

Steklena cev notranjega premera 2 do 4 mm za dotok zraka. Odprtina cevi naj bo približno 1 cm nad dnom posode.

Centrifuga (približno 3 550 g).

Merilec pH vrednosti.

Merilec raztopljenega kisika.

Papirni filtri.

Naprave za membransko filtracijo.

Filtrirne membrane z velikostjo por 0,45 μm. Filtrirne membrane so primerne, če je zagotovljeno, da ne izpuščajo ogljika in ne absorbirajo snovi med filtriranjem.

Analitska oprema za določanje vsebnosti organskega ogljika in kemijske potrebe po kisiku.

1.6.1.3 Priprava inokuluma

Aktivno blato iz biološke čistilne naprave se spere s (ponavljajočim) centrifugiranjem ali usedanjem v preskusni vodi (zgoraj).

Aktivno blato mora biti v ustreznem stanju. Takšno blato je na voljo v primerno delujoči čistilni napravi odpadnih vod. Da bi dobili čim več različnih vrst ali sevov bakterij, je priporočljivo zmešati inokulume iz različnih virov (npr. različne čistilne naprave, ekstrakti tal, rečnih vod, itd.). Mešanico je treba tretirati, kot je opisano zgoraj.

Za preverjanje aktivnosti aktivnega blata glej točko „Funkcionalni nadzor“ spodaj.

1.6.1.4 Priprava preskusnih raztopin

V preskusno posodo dodajte 500 ml preskusne vode, 2,5 ml/liter mineralne hranilne raztopine in aktivno blato v količini, ki ustreza od 0,2 do 1,0 g/liter suhe snovi v končni mešanici. Dodajte zadostno količino osnovne raztopine preskusne snovi, da bo v končni mešanici koncentracija DOC od 50 do 400 mg/liter. Ustrezne vrednosti KPK so 100 do 1 000 mg/liter. Dopolnite s preskusno vodo do skupne prostornine od enega do štirih litrov. Skupna prostornina, ki jo je treba izbrati, je odvisna od števila vzorcev, ki jih je treba vzeti za določitev DOC ali KPK, ter prostornin, potrebnih za analitski postopek.

Običajno je zadovoljiva prostornina dveh litrov. Sestavi se najmanj ena kontrolna posoda (negativna kontrola), vzporedno z vsako preskusno serijo; ta vsebuje samo aktivno blato in mineralno hranilno raztopino v preskusni vodi enake skupne prostornine kot v preskusnih posodah.

1.6.2 *Izvajanje preskusa*

Preskusne posode se premešajo z magnetnimi mešali ali propelerji pod razpršeno svetlobo ali v temnem prostoru pri 20 do 25 °C. Prezračevanje se doseže s stisnjenim zrakom, po potrebi prečiščenim skozi bombažni filter in, če je potrebno steklenico za pranje. Zagotoviti je treba, da se blato ne usede, in da koncentracija kisika ne pade pod 2 mg/liter.

pH vrednost je treba preverjati v rednih časovnih presledkih (npr. vsak dan) in po potrebi prilagoditi na pH 7 do 8.

Izgube zaradi izhlapevanja se nadomesti tik pred vsakim vzorčenjem z deionizirano ali destilirano vodo v zahtevanih količinah. Dober postopek je označevanje nivoja tekočine na posodi pred začetkom preskusa. Nove oznake se naredijo po vsakem vzorčenju (brez zračenja in mešanja). Prvi vzorci se vedno vzamejo tri ure po začetku preskusa, da bi se odkrilo adsorpcijo preskusnega materiala v aktivnem blatu.

Odstranitvi preskusnega materiala se sledi z določitvami DOC in KPK, ki se jih opravi vsak dan ali v kakšnem drugem rednem časovnem presledku. Vzorci iz preskusne posode ali negativne kontrole se prefiltrirajo skozi previdno opran papirni filter. Prvih 5 ml filtrata preskusne snovi se zavrže. Blato, ki ga je težko filtrirati, se lahko predhodno odstrani z 10 minutnim centrifugiranjem. Določitve DOC in KPK se opravijo najmanj v dvojniku. Preskus poteka do 28 dni.

Opomba: Vzorci, ki ostanejo motni, se prefiltrirajo skozi membranske filtre. Membranski filtri ne smejo prepuščati ali adsorbirati nikakršnega organskega materiala.

Funkcionalni nadzor aktivnega blata

Posoda, ki vsebuje znano snov, se uporabi vzporedno z vsako preskusno serijo, da se preveri funkcionalno zmogljivost aktivnega blata. V ta namen velja za uporabnega dietilenglikol.

Prilagoditev

Če se analize opravijo v relativno kratkih časovnih presledkih (npr. vsak dan), je prilagoditev mogoče jasno prepoznati na krivulji razgradnje (glej Sliko 2). Preskus naj se zato ne prične tik pred koncem tedna.

Če do prilagoditve pride ob koncu tega obdobja, je preskus mogoče podaljšati do zaključka razgradnje.

Opomba: Če je potrebno širše poznavanje vedenja prilagojenega blata, se isto aktivno blato še enkrat izpostavi istemu preskusnemu materialu v skladu z naslednjim postopkom:

Izklopite mešalo in prezračevalo ter pustite, da se aktivno blato usede. Odlijte tekočino supernatanta, napolnite do dveh litrov s preskusno vodo, mešajte 15 minut in ponovno pustite, da se usede. Ko ponovno odlijete tekočino supernatanta, uporabite preostalo blato za ponovitev preskusa z enakim materialom v skladu z 1.6.1.4 in 1.6.2 zgoraj. Aktivno blato je namesto s usedanjem mogoče izolirati tudi s centrifugiranjem.

Prilagojeno blat se lahko zmeša s svežim blatom do koncentracije 0,2 do 1 g suhe teže/liter.

Analitska sredstva

Vzorci se običajno filtrirajo skozi previdno opran papirni filter (za pranje uporabite deionizirano vodo).

Vzorci, ki ostanejo motni, se filtrirajo skozi membranske filtre (0,45 μm).

Koncentracija DOC se določi v dvojniku v filtratih vzorcev (prvih 5 ml se zavrže) s pomočjo instrumenta za določanje TOC. Če filtrata ni mogoče analizirati še isti dan, se ga mora do naslednjega dne shraniti v hladilniku. Daljše shranjevanje ni priporočljivo.

Koncentracijo KPK se določi v filtratih vzorcev z analitskim postopkom, opisanim v viru (2) spodaj.

2. PODATKI IN OCENA

Koncentracije DOC in/ali KPK se določijo najmanj v dvojniku na vzorcih, v skladu s 1.6.2 zgoraj. Razgradnja v času T se izračuna v skladu s formulo (z opredelitvami pojmov), podano v točki 1.2 zgoraj.

Obseg razgradnje se zaokroži na najbližji celi odstotek. Obseg razgradnje, dosežene na koncu preskusa, se opiše kot „Biorazgradljivost v Zahn – Wellensovem preskusu“.

Opomba: Če je do popolne razgradnje prišlo pred zaključkom preskusa in je ta rezultat potrjen z drugo analizo, opravljeno naslednji dan, se preskus lahko zaključi.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— začetna koncentracija snovi,

— vsi drugi podatki in rezultati preskusa v zvezi s preskusno snovjo, referenčno snovjo, če je uporabljena, in negativno kontrola,

— koncentracija po treh urah,

— krivulja biorazgradnje z opisom,

— datum in mesto vzorčenja preskusnih organizmov, status prilagoditve, uporabljena koncentracija, itd.,

— znanstveni razlogi za vsako spremembo preskusnega postopka.

3.2 Razlaga rezultatov

Odstranitev DOC (KPK), ki poteka postopoma nekaj dni ali tednov, pomeni, da se preskusna snov biološko razgrajuje.

Svojo vlogo pa lahko v nekaterih primerih odigra tudi fizikalno-kemijska adsorpcija, to pa se pokaže, kadar gre za celotno ali delno odstranitev na samem začetku, v prvih treh urah, razlika med kontrolo in preskusnimi supernatantnimi raztopinami pa ostaja na nepričakovano nizki ravni.

Če je treba določiti razliko med biorazgradnjo (ali delno biorazgradnjo) in adsorpcijo so potrebni dodatni preskusi.

To je mogoče opraviti na številne načine, najprepričljivejša pa je uporaba supernatanta ali blata kot inokuluma v preskusu osnovne zbirke (po možnosti respirometrični preskus).

Preskusne snovi, ki v tem preskusu dajo visoko, neadsorptivno odstranitev DOC (KPK) je treba šteti za potencialno biorazgradljive. Delna, neadsorptivna odstranitev pomeni, da je kemikalija do neke mere podvržena nekakšni biorazgradnji. Nizka ali nična odstranitev DOC (KPK) lahko pomeni, da preskusna snov zavira mikroorganizme, to pa je mogoče ugotoviti tudi z lizo in izgubo blata, kar povzroča motne supernatante. Preskus je treba ponoviti z uporabo nižje koncentracije preskusne snovi.

Uporaba za spojino značilne analitske metode ali preskusne snovi s ^{14}C označeno preskusno snovjo lahko omogoči večjo občutljivost. V primeru ^{14}C preskusne spojine bo obnovitev $^{14}CO_2$ potrdila, da je prišlo do biorazgradnje.

Kadar so rezultati podani za primarno biorazgradnjo, je treba, če je mogoče, razložiti spremembo kemijske strukture, ki povzroča zmanjšanje odziva matične preskusne snovi.

Validacija analitske metode mora biti podana skupaj z opaženim odzivom, v preskusnem mediju negativne kontrole.

4. **VIRI**

(1) OECD, Pariz, 1981, *Test Guideline 302 B,* Decision of the Council C(81)30 final.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, *Official Journal of the European Communities*, L 251, 19.9.1984.

Dodatek

PRIMER OCENE

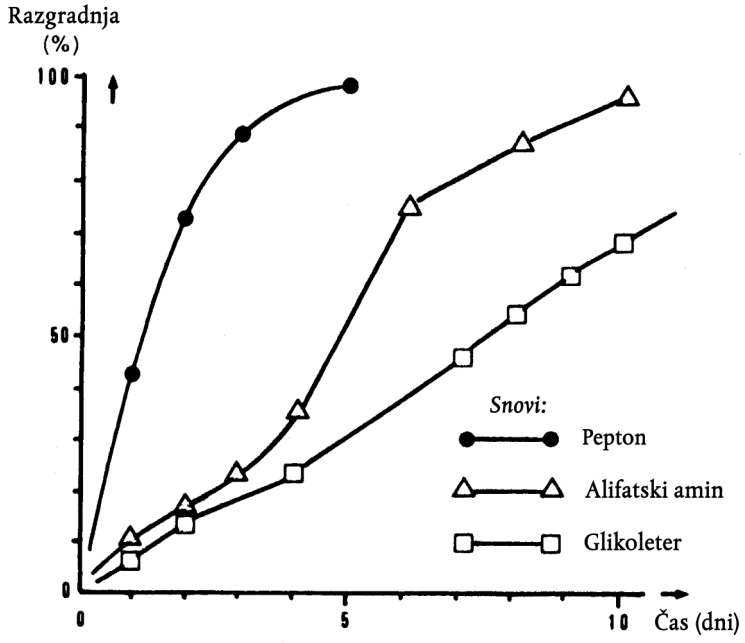
Organska spojina:	4-etoksibenzenska kislina
Teoretična preskusna koncentracija:	600 mg/l
Teoretični DOC:	390 mg/l
Inokulum:	Čistilna naprava odplak
Koncentracija:	1 gram suhega materiala/liter
Status prilagoditve:	neprilagojen
Analiza:	Določitev DOC
Količina vzorca:	3 ml
Kontrolna snov:	Dietilenglikol
Strupenost spojine:	Ni strupenih učinkov pod 1 000 mg/l Uporabljen preskus: preskus s fermentacijskimi cevmi

Trajanje preskusa	Kontrolna snov				Preskusna snov		
	negativna kontrola ROO (1) mg/l	DOC (1) mg/l	KPK neto mg/l	Razgradnja %	DOC (1) mg/l	KPK neto mg/l	Razgradnja %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 ure	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 dan	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dneva	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	20,2	2,0	99

(1) Srednje vrednosti treh določitev.

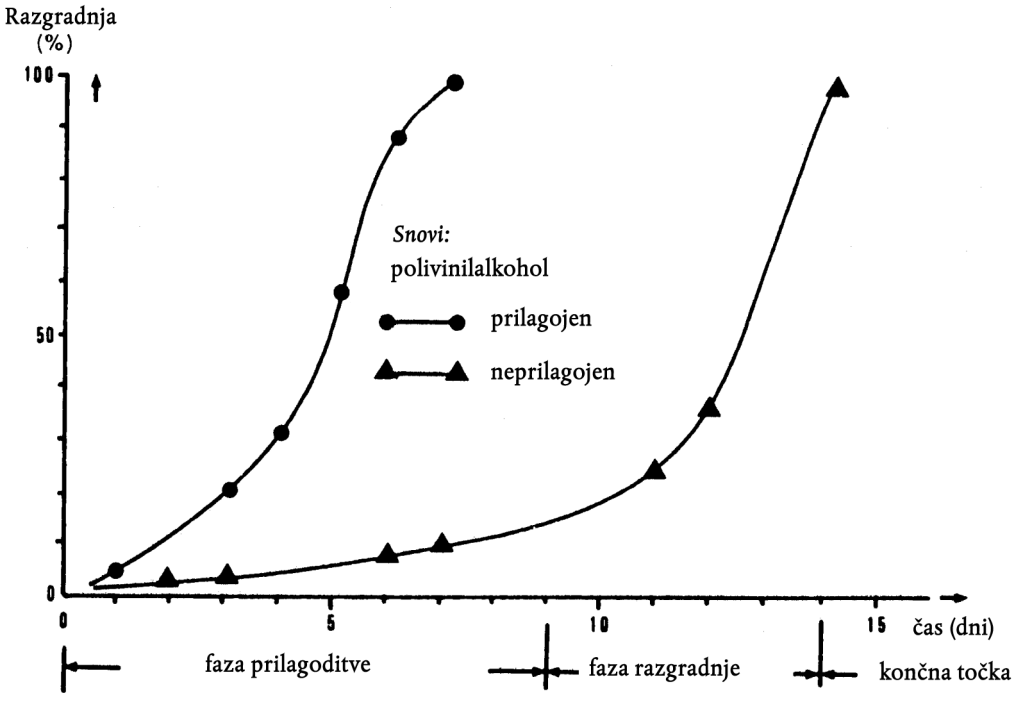
Slika 1

Primeri krivulj biorazgradnje



Slika 2

Primeri prilagoditve blata



BIORAZGRADNJA

SIMULACIJSKI PRESKUSI Z AKTIVNIM BLATOM

1. METODA

1.1 Uvod

1.1.1 *Splošne opombe*

Ta metoda se uporablja le za tiste organske snovi, ki pri koncentraciji, uporabljeni v preskusu:

— so topne v vodi v obsegu, potrebnem za pripravo preskusne raztopine,

— imajo zanemarljiv parni tlak v preskusnih pogojih,

— ne zavirajo bakterij.

Podatki o relativnih deležih glavnih sestavin preskusnega materiala bodo uporabni pri razlagi dobljenih rezultatov, zlasti v primerih, kadar so ti rezultati nizki ali zanemarljivi.

Podatki o strupenosti snovi za mikroorganizme so zaželeni za razlago nizkih rezultatov in za izbiro ustreznih preskusnih koncentracij.

1.1.2 *Določitev končne biorazgradljivosti (analiza DOC/KPK)*

Namen te metode je določitev končne biorazgradljivosti z merjenjem odstranitve snovi in vseh metabolitov iz modela čistilne naprave z aktivnim blatom pri koncentraciji, ki ustreza > 12 mg DOC/liter (ali približno 40 mg KPK/liter); za optimalno velja 20 mg DOC/liter. (DOC = raztopljeni organski ogljik; KPK = kemijska potreba po kisiku).

Ugotoviti je treba vsebnost organskega ogljika (ali kemijske potrebe po kisiku) v preskusnem materialu.

1.1.3 *Določitev primarne biorazgradljivosti (specifična analiza)*

Namen te metode je določitev primarne biorazgradljivosti snovi v modelu čistilne naprave z aktivnim blatom pri koncentraciji približno 20 mg/liter z uporabospecifične analitske metode (če analitska metoda in upoštevanje strupenosti tako dovoljujeta, je mogoče uporabiti nižje ali višje koncentracije). S tem je omogočena ocena primarne biorazgradljivosti snovi (izginotje matične kemijske strukture).

Namen te metode *ni* določitev mineralizacije preskusne snovi.

Na voljo mora biti ustrezna analitska metoda za določitev preskusne snovi.

1.2 Opredelitev pojmov in enote

1.2.1 *Analiza DOC/KPK*

Stopnja odstranitve snovi se poda z:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\ \% \qquad [1(a)]$$

pri čemer je:

DR = stopnja odstranitve DOC (ali KPK) v odstotkih znotraj danega srednjega retencijskega časa glede na preskusni material,

T = koncentracija preskusnega materiala v pritoku v mg DOC/liter (ali mg KPK/liter),

E = koncentracija DOC (ali KPK) v iztoku preskusne enote v mg DOC/liter (ali mg KPK/liter),

E_0 = koncentracija DOC (ali KPK) v iztoku negativne kontrole v mg DOC/liter (ali mg KPK/liter).

Razgradnja se navede kot odstotek odstranitve DOC (ali KPK) v danem retencijskem času glede na preskusni material.

1.2.2 *Specifična analiza*

Odstotek odstranitve preskusne snovi iz vodne faze (R_W) v danem srednjem retencijskem času se poda z:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

pri čemer je:

C_1 = koncentracija snovi v pritoku preskusne enote (mg snovi/liter, določeno s specifično analizo),

C_0 = koncentracija snovi v iztoku preskusne enote (mg snovi/liter, določeno s specifično analizo).

1.3 **Referenčne snovi**

V nekaterih primerih, kadar se preiskujejo nove snovi, so referenčne snovi lahko uporabne; vendar pa še ni mogoče priporočiti specifične referenčne snovi.

1.4 **Princip preskusne metode**

Za določitev končne biorazgradljivosti potekata vzporedno dve pilotski enoti aktivnega blata (OECD potrditveni preskus ali preskus z enotami poroznih posod). Preskusna snov se doda pritoku (sintetične ali gospodinjske odplake) ene izmed enot, medtem ko druga prejme samo odplake. Za določitev primarne biorazgradnje s specifično analizo v pritoku in iztoku se uporabi le ena enota.

Koncentracije DOC (ali KPK) se merijo v iztokih ali pa se koncentracije snovi določijo s specifično analizo.

DOC preskusnega materiala se ne meri, ampak se le navede.

Kadar se opravljajo meritve DOC (ali KPK), se smatra, da je razlika v povprečnih koncentracijah med preskusnimi in kontrolnimi iztoki posledica nerazgrajenega preskusnega materiala.

Pri izvajanju specifičnih analiz, je mogoče izmeriti spremembo v koncentraciji matične molekule (primarna biorazgradnja).

Z enotami se lahko upravlja po „sistemu spojenih enot“, s postopkom transinokulacije.

1.5 **Merila kakovosti**

Začetna koncentracija snovi je odvisna od tipa izvedene analize in njenih omejitev.

1.6 **Opis preskusne metode**

1.6.1 *Priprave*

1.6.1.1 Naprave

Potreben je par enot istega tipa, razen kadar se izvaja specifična analiza.

Uporabita se lahko dva tipa naprav:

OECD potrditveni preskus

Oprema (Dodatek 1) vsebuje posodo za shranjevanje (A) sintetičnih odplak, dozirno črpalko (B), prezračevalno posodo(C), usedalnik (D), „air-lift“ črpalko (E) za recikliranje aktivnega blata in posodo (F) za zbiranje tretiranega iztoka.

Posodi (A) in (F) morata biti iz stekla ali ustrezne plastike in držati najmanj 24 litrov. Črpalka (B) mora omogočati neprekinjen pretok sintetičnih odplak do prezračevalne posode za; uporabiti je mogoče kakršen koli ustrezen sistem, pod pogojem, da sta zagotovljena tako dotok kot koncentracija. Pri normalnem delovanju je višina usedalnika (D) nastavljena tako, da prostornina v prezračevalni posodi za znaša tri litre suspenzije aktivnega blata. Prezračevalo iz sintranega stekla (G) se potopi v posodo (C) pri vrhu stožca. Količina zraka, izpihnjenega skozi prezračevalo, se lahko spremlja s pomočjo merilnika pretoka.

„air-lift“ črpalka (E) se postavi tako, da se aktivno blato iz usedalnika neprekinjeno in redno reciklira v prezračevalno (C).

„Porozna posoda“

Porozna posoda je sestavljena iz plošč s poroznega polietilena (debeline 2 mm, največja velikost por 95 μm), ki so oblikovani v cilindre premera 14 cm, s stožčastim dnom 45° (Sliki 1 in 2 Dodatka 2). Porozna posoda stoji v neprepustni posodi iz ustrezne plastike premera 15 cm z odtokom na višini 17,2 cm na cilindričnem delu, ki določa prostornino (3 litri) v porozni posodi. Vrh notranje posode obdaja togi podporni obroč iz ustrezne plastike, tako da je med notranjo in zunanjo posodo prostor za iztok 0,5 cm.

Porozne posode se lahko namestijo na dno vodne kopeli s termostatom. Do dna notranje posode, na katero so nameščeni ustrezni difuzorji, vodi dovod zraka.

Posodi (A) in (E) morata biti iz stekla ali ustrezne plastike in držati najmanj 24 litrov. Črpalka (B) mora omogočati neprekinjen pretok sintetičnih odplak do prezračevalne posode; uporabiti je mogoče kakršen koli ustrezen sistem, pod pogojem, da sta zagotovljena dotok in koncentracija.

Zahtevane so dodatne notranje porozne posode, za zamenjavo tistih, ki bi se lahko med uporabo zamašile; zamašene posode se očistijo tako, da se za 24 ur potopijo v raztopino hipoklorita, čemur sledi temeljito pranje v vodi iz pipe.

1.6.1.2 Filtriranje

Naprave za membransko filtracijo in membranski filtri z velikostjo por 0,45 μm. Membranski filtri so primerni le, če je zagotovljeno, da med filtriranjem ne izpuščajo ogljika in ne adsorbirajo snovi.

1.6.1.3 Odplake

Uporabi se lahko bodisi ustrezna sintetiče substrate bodisi gospodinjske odplake.

Primer sintetičnih substratov

Raztopiti v vsakem litru vode iz pipe:

Pepton:	160 mg
Mesni ekstrakt:	110 mg
Sečnina:	30 mg
NaCl:	7 mg
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg
K_2HPO_4:	28 mg

Gospodinjske odplake

Te je treba zbirati sveže vsak dan iz zbirališča v primarnem usedalniku čistilne naprave, ki predvsem obdeluje gospodinjske odplake.

1.6.1.4 Osnovna raztopina preskusnega materiala

Pripraviti je treba npr. 1 % raztopino preskusnega materiala, da se doda preskusni enoti. Ugotoviti je treba koncentracijo materiala, da se odplakam ali neposredno enoti preko druge črpalke doda ustrezna količina, s čimer se doseže zahtevana preskusna koncentracija.

1.6.1.5 Inokulum

Opomba: Pri uporabi gospodinjskih odplak bi bilo nesmiselno uporabljati inokulum z nizko koncentracijo bakterij, zato se namesto njega lahko uporabi aktivno blato.

Uporabi se lahko različne inokulume.

Podani so trije primeri ustreznih inokulumov:

(a) Inokulum iz sekundarnega iztoka

Inokulum je treba pridobiti iz sekundarnega iztoka dobre kakovosti, zbranega iz čistilne naprave, ki pretežno obdeluje gospodinjske odplake. Iztok se mora obdobju med vzorčenjem in uporabo hraniti v aerobnih pogojih. Za pripravo inokuluma se vzorec prefiltrira skozi grob filter, prvih 200 ml se zavrže. Filtrat se do uporabe ohranja v aerobnem stanju. Inokulum se mora uporabiti na dan, ko je bil zbran. Za inokulacijo je treba uporabiti najmanj 3 ml inokuluma.

(b) Sestavljeni inokulum

Inokulum iz sekundarnega iztoka:

Glej opis zgoraj.

Inokulum iz prsti:

100 g vrtne prsti (plodne, ne sterilne) se suspendira v 1 000 ml pitne vode, ki ne vsebuje klora. (Prsti z zelo velikim deležem gline, peska ali humusa niso ustrezne.) Po mešanju se suspenzija pusti 30 minut, da se usede. Supernatant se prefiltrira skozi grob filtrirni papir, prvih 200 ml se zavrže. Filtrat se prezrači takoj in se ga prezračuje do uporabe. Inokulum se mora uporabiti na dan, ko je bil zbran.

Inokulum iz površinske vode:

Dodatni delni inokulum se pridobi iz mezosaprobne površinske vode. Vzorec se prefiltrira skozi grobi papir, prvih 200 ml se zavrže. Filtrat se do uporabe ohranja v aerobnem stanju. Inokulum se mora uporabiti na dan, ko je bil zbran.

Enake prostornine treh delnih vzorcev inokuluma se združijo, dobro premešajo, končni inokulum pa se pridobi iz dobljene mešanice. Za inokulacijo je treba uporabiti najmanj 3 ml inokuluma.

(c) Inokulum iz aktivega blata

Za inokulum se lahko uporabi prostornina (ne več kot 3 litri) aktivnega blata (vsebnost suspendiranih trdnih snovi do 2,5 g/liter), vzetega iz prezračevalnega bazena čistilne naprave, ki pretežno obdeluje gospodinjske odplake.

1.6.2 *Postopek*

Preskus se opravlja pri sobni temperaturi; ta naj se vzdržuje med 18 in 25 °C.

Če je primerno, se preskus lahko opravi pri nižji temperaturi (do 10 °C); če se snov razgradi, se običajno ne zahtevajo dodatni postopki. Če pa se snov ne razgradi, je treba preskus opraviti pri stalni temperaturi med 18 in 25 °C.

1.6.2.1 Pripravljalno obdobje: Tvorba/stabilizacija blata enot

Rast blata/obdobje stabilizacije je obdobje, v katerem koncentracija suspendiranih trdnih snovi aktivnega blata in delovanje enot preide v konstantno stanje v uporabljenih pogojih delovanja.

Pripravljalno obdobje je obdobje, ki traja od trenutka, ko se prvič doda preskusna snov, do trenutka, ko njeno odstranjevanje doseže konstanten nivo (relativno konstantna vrednost). To obdobje ne sme presegati šestih tednov.

Obdobje ocenjevanja je tritedensko obdobje po tem, ko odstranjevanje preskusne snovi doseže relativno konstantno, in ponavadi visoko, vrednost. Za tiste snovi, ki v prvih šestih tednih kažejo nizko razgradljivost ali pa se sploh ne razgrajujejo, se za obdobje ocenjevanja vzamejo naslednji trije tedni.

Na začetku napolnite enoto(e), potrebno(e) za en preskus, z mešanico inokuluma in pritoka.

Nato se v delovanje spravi prezračevalo (in „air-lift“ (E) v primeru enot OECD potrditvenega preskusa) ter dozirna naprava.

Pritok, v katerem ni preskusne snovi, mora iti skozi prezračevalno posodo (C) bodisi v pretoku enega litra na uro ali pol litra na uro; s tem dobimo srednji retencijski čas treh ali šestih ur.

Stopnjo prezračevanja je treba uravnavati, tako da vsebina posode (C) ves čas ostaja v suspenziji, medtem ko je vsebnost raztopljenega kisika najmanj 2 mg/liter.

Penjenje je treba preprečiti z ustreznimi sredstvi. Ne smejo se uporabiti sredstva proti penjenju, ki zavirajo aktivno blato.

Blato, ki se je nakopičilo na vrhu prezračevalne (C) (in, v primeru enot OECD potrditvenega preskusa, na dnu usedalnika (D) in v krožnem toku) se mora s krtačenjem ali na kak drug način vrniti nazaj v suspenzijo aktivnega blata najmanj enkrat na dan.

Kadar se blato ne usede, se lahko njegovo gostoto poveča z dodatkom 2 ml delov 5 % raztopine železovega klorida, kar se po potrebi ponovi.

Iztok se zbira v posodi (E ali F) 20 do 24 ur, vzorec pa se vzame po temeljitem mešanju. Posodo (E ali F) je treba temeljito očistiti.

Da bi spremljali in nadzorovali učinkovitost procesa, se kemijska potreba po kisiku (KPK) ali raztopljeni organski ogljik (DOC) filtrata nakopičenega izpusta meri najmanj dvakrat tedensko, prav tako tudi KPK in DOC filtriranega pritoka (z uporabo membrane z velikostjo por 0,45 μm, prvih 20 ml (približno) filtrata se zavrže).

Upad DOC ali KPK bi se moral stabilizirati, ko se doseže približno stalno dnevno razgradnjo.

Vsebnost suhe snovi aktivnega blata v prezračevalnem bazenu je treba določiti dvakrat tedensko (v g/liter). Enote je mogoče upravljati na dva načina: ali se vsebnost suhe snovi aktivnega blata določa dvakrat tedensko, in če gre za več kot 2,5 g/liter, se mora presežek aktivnega blata zavreči, ali pa se vsak dan odvrže iz vsake posode 500 ml suspenzije aktivnega blata, s čimer dobimo srednji retencijski čas blata šest dni.

Kadar so izmerjeni in ocenjeni parametri (učinkovitost procesa (pri odstranitvi KPK ali DOC), koncentracija blata, usedanje blata, motnost iztokov, itd.) dveh enot dovolj ustaljeni, se lahko preskusna snov daje v pritok ene izmed enot, ob upoštevanju 1.6.2.2.

Preskusna snov pa se lahko doda že na začetku obdobja rasti blata (1.6.2.1), še zlasti kadar se blato doda kot inokulum.

1.6.2.2 Preskusni postopek

Ohranjajo se delovni pogoji pripravljalnega obdobja, zadostna količina osnovne raztopine (približno 1 %) preskusnega materiala pa se doda pritoku preskusne enote, da bi se dobila zaželena koncentracija preskusnega materiala (približno 10 do 20 mg DOC/liter ali 40 mg KPK/liter) v odplakah. To se lahko naredi z vsakodnevnim vmešanjem osnovne raztopine k odplakam ali s pomočjo ločenega črpalnega sistema. Navedena koncentracija se lahko doseže postopoma. Če preskusna snov na aktivnem blatu ne povzroča nobenih strupenih učinkov, je mogoče preskušati višje koncentracije.

Enoti negativne kontrole se doda le pritok brez dodanih snovi. Ustrezne prostornine iztokov se vzamejo za analizo in prefiltrirajo skozi membranske filtre (0,45 μm), prvih 20 ml (približno) filtrata pa se zavrže.

Prefiltrirane vzorce je treba analizirati še isti dan, sicer se morajo shraniti s pomočjo katere koli ustrezne metode, na primer z uporabo 0,05 ml 1 % raztopine živosrebrovega klorida ($HgCl_2$) za vsakih 10 ml filtrata ali tako, da se jih do 24 ur hrani pri 2 do 4 °C ali za daljše obdobje pod – 18 °C.

Čas pripravljanja vključno z dodajanjem preskusne snovi ne sme preseči šest tednov, obdobje ocenjevanja pa ne sme biti krajše od treh tednov, za izračun končnega rezultata mora biti na voljo 14 do 20 določitev.

Način spojenih enot

Spajanje enot se doseže z izmenjavanjem 1,5 litra suspenzije aktivnega blata (vključno z blatom) iz prezračevalnih posod aktivnega blata med dvema enotama enkrat dnevno. V primeru močno absorptivnih preskusnih materialov se iz usedalnikov vzame le 1,5 litra supernatantne tekočine in se jo izlije v posodo z aktivnim blatom druge enote.

1.6.2.3 Analiza

Da bi spremljali obnašanje snovi, je mogoče opraviti dve vrsti analize:

DOC in KPK

Koncentracije DOC se določijo v dvojniku z analizatorjem ogljika in/ali KPK vrednostmi, v skladu z virom (2).

Specifična analiza

Koncentracije preskusne snovi se določijo z ustrezno analitsko metodo. Kadar je to mogoče, se opravi določitev snovi, absorbirane na blatu.

2. PODATKI IN OCENA

2.1 Način spojenih enot

Pri uporabi „načina spojenih enot“ se dnevne stopnje odstranitve (SO) izračunajo v skladu z 1.2.1.

Navedene dnevne stopnje odstranitve (SO) se popravijo v SOc za prenos materiala zaradi procesa transinokulacije z enačbo [2] za triurni ali z enačbo [3] za šesturni srednji retencijski čas.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Izračuna se srednja vrednost nizov vrednosti SOc, z enačbo [4] pa še standardna deviacija

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DRc_i\right)^2}{n-1}} \quad [4]$$

pri čemer je:

S_{SOc} = standardna deviacija niza vrednosti SOc,

$D\overline{R}$ = srednja vrednost SOc,

n = število določitev.

Napačne vrednosti (outliers) niza SOc se izločijo v skladu z ustreznim statističnim postopkom, npr. Nalimov (6), pri 95 % stopnji verjetnosti, ponovno pa se izračuna še srednjo vrednost in standardno deviacijo podatka o SOc brez napačnih vrednosti.

Končni rezultat se na to izračuna z enačbo [5]

$$DRc = D\overline{R} \pm \frac{t_{n-1;\ \alpha}}{\sqrt{n}} s_{DRc} \quad [5]$$

pri čemer je:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelarna vrednost t za n vrednostnih parov E in E_0 in statistično zaupanje P (P = 1 - α), pri čemer je P določen na 95 % (1).

Rezultat se prikaže kot povprečje z mejami tolerance pri 95 % stopnji verjetnosti, ustrezni standardni deviaciji in število podatkov podatkovnega niza o SOc brez napačnih vrednosti ter število napačnih vrednosti (outliers), npr

SOc = 98,6 ± 2,3 % odstranitve DOC,

s = 4,65 % odstranitve DOC,

n = 18,

x = število napačnih vrednosti (outliers).

2.2 **Način nespojenih enot**

Delovanje enot se lahko preveri z:

$$\text{odstotek odstranitve KPK ali DOC} = \frac{\text{KPK ali DOC odplak - KPK ali DOC iztoka}}{\text{KPK ali DOC odplak}} \times 100$$

Navedene dnevne odstranitve se lahko grafično prikažejo, da se odkrijejo kakršni koli trendi npr. pri prilagoditvah.

2.2.1 *Uporaba določitev KPK/DOC*

Dnevna stopnja odstranitve (SO) se izračuna v skladu z 1.2.1.

Izračuna se srednjo vrednost podatkov SO; poleg tega se standardna deviacija izračuna v skladu z:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DR_i\right)^2}{n-1}} \quad [6]$$

pri čemer je:

S_{SO} = standardna deviacija niza vrednosti SO_i,

$D\overline{R}$ = srednja vrednost SO_i,

n = število določitev.

Napačne vrednosti (outliers) niza SOc se izločijo v skladu z ustreznim statističnim postopkom, npr. Nalimov (6), pri 95 % stopnji verjetnosti, ponovno pa se izračuna še srednjo vrednost in standardno deviacijo podatka o SOc brez napačnih vrednosti.

Končni rezultat se nato izračuna z enačbo [7] kot

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\ \alpha}}{\sqrt{n}}\ s_{DR} \qquad [7]$$

pri čemer je:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabelarna vrednost t za n vrednostnih parov E in E_0 in statistično zaupanje P (P = 1 - α), pri čemer je P določen na 95 % (1).

Rezultat se prikaže kot povprečje z mejami tolerance pri 95 % stopnji verjetnosti, ustrezno standardno deviacijo in število podatkov podatkovnega niza o SOc brez napačnih vrednosti ter število napačnih vrednosti, npr.

SOc = (98,6 ± 2,3) % odstranitve DOC,

s = 4,65 % odstranitve DOC,

n = 18,

x = število napačnih vrednosti.

2.2.2 *Uporaba specifične analize*

Odstotek odstranitve preskusne snovi iz vodne faze (R_w) se izračuna v skladu z 1.2.2.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— obrazec, podan v Dodatku 3, ki prikazuje pogoje delovanja za preskus,

— izbrana naprava (potrditveni preskus OECD ali preskus s poroznimi posodami)

— izbrani delovni način: način spojenih metod ali ne,

— izbrane odplake: sintetične ali gospodinjske – v primeru gospodinjskih odplak datum in lokacija vzorca,

— izbrani inokulum z datumom in lokacijo vzorca,

— izjava z opisom analitske metode, če so bile opravljene specifične analize,

— prikaz odstranitve KPK ali DOC ob času, vključno s pripravljalnim in obdobjem ocenjevanja,

— analitska rekuperacija preskusne snovi kot KPK ali DOC v osnovni raztopini,

— prikaz odstotka odstranitve preskusne snovi iz vodne faze v odvisnosti od časa (pripravljalno obdobje in obdobje ocenjevanja), če so bile opravljene specifične analize,

— povprečna odstranitev DOC ali KPK preskusne snovi in standardno deviacijo se izračuna iz rezultatov v obdobju ocenjevanja, tj. kadar gre za ustaljeno odstranitev preskusnega materiala ali obdobje ustaljenega delovanja,

— prikaz koncentracije aktivnega blata v odvisnosti od časa,

— vse opombe v zvezi z aktivnim blatom (izločitev presežnega blata, kopičenje, $FeCl_3$, itd.)

— koncentracija snovi, uporabljene v preskusu,

— vsi rezultati v zvezi z analizo, opravljeno na blatu,

— vsi podatki in rezultati preskusa v zvezi s preskusno snovjo in referenčno snovjo, če je uporabljena,

— znanstveni razlogi za vse spremembe postopka.

3.2 **Razlaga rezultatov**

Nizka odstranitev preskusne snovi iz vodne faze je lahko posledica zaviranja mikroorganizmov s preskusno snovjo. To je mogoče odkriti tudi z lizo in izgubo blata, kar povzroča motne supernatante, ter s povečanjem učinkovitosti odstranitve KPK (ali ROO) pilotske naprave.

Svojo vlogo lahko včasih odigra tudi fizikalno-kemijska adsorpcija. Razlike med biološkim delovanjem na molekulo in fizikalno-kemijsko adsorpcijo je mogoče prikazati z analizo, opravljeno na blatu po ustrezni desorpciji.

Dodatni preskusi so potrebni, če je treba ločiti med biorazgradnjo (ali delno biorazgradnjo) in adsorpcijo.

To je mogoče opraviti na številne načine, najprepričljivejša pa je uporaba supernatanta kot inokuluma v preskusu iz osnovne zbirke (po možnosti v respirometričnem preskusu).

Če je opažena visoka odstranitev DOC ali KPK, je le-ta posledica biorazgradnje, medtem ko se pri nizkih odstranitvah biorazgradnja ne da razločiti od izločitve. Na primer, če topna spojina kaže visoko adsorpcijsko konstanto v višini 98 %, stopnja izgube odvečnega blata pa je dnevno 10 %, je možna do 40 % izločitev; pri 30 % stopnji izgube odvečnega blata lahko izločitev zaradi adsorpcije in odstranitve odvečnega blata doseže 65 % (4).

Pri uporabi specifične analize je treba pozornost posvetiti razmerju med strukturo snovi in uporabljeno specifično analizo. V tem primeru opaženega pojava ni mogoče interpretirati kot mineralizacijo snovi.

4. **VIRI**

(1) OECD, Pariz, 1981, *Test Guideline 303 A*, Decision of the Council C(81)30 final.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, *Official Journal of the European Communities*, L 251, 19.9.1984.

(3) Painter, H. A., King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability,* Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, Združeno kraljestvo.

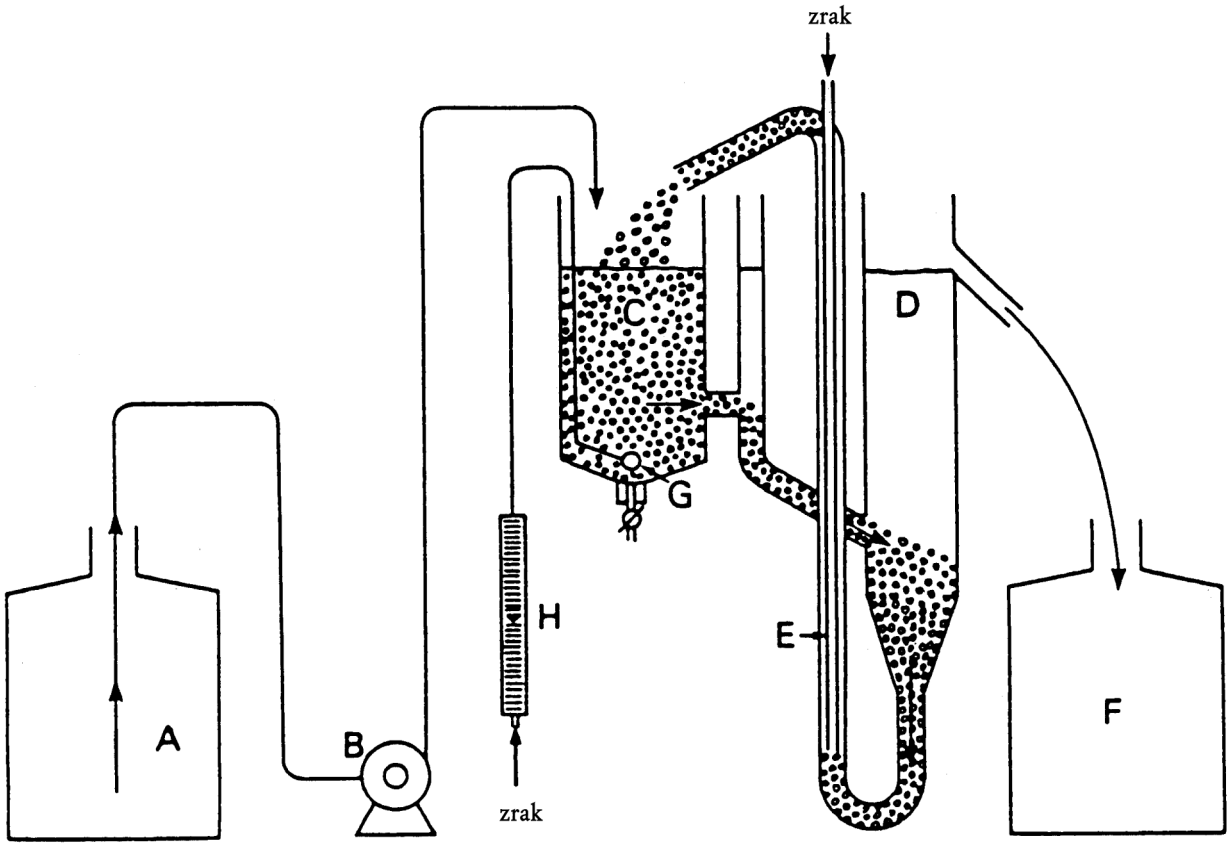
(4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, zv. 5, junij 1981, str. 161 do 171.

(5) Council Directive 82/242/EEC and 82/243/EEC, *Official Journal of the European Communities*, L 109, 22.4.1982, amending Council Directive 73/404/EEC in 73/405/EEC on biodegradability of detergents, *Official Journal of the European Communities*, L 347, 17.12.1973.

(6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitscrift für Analytische Chemie*, 303(1980), str. 406 do 408.

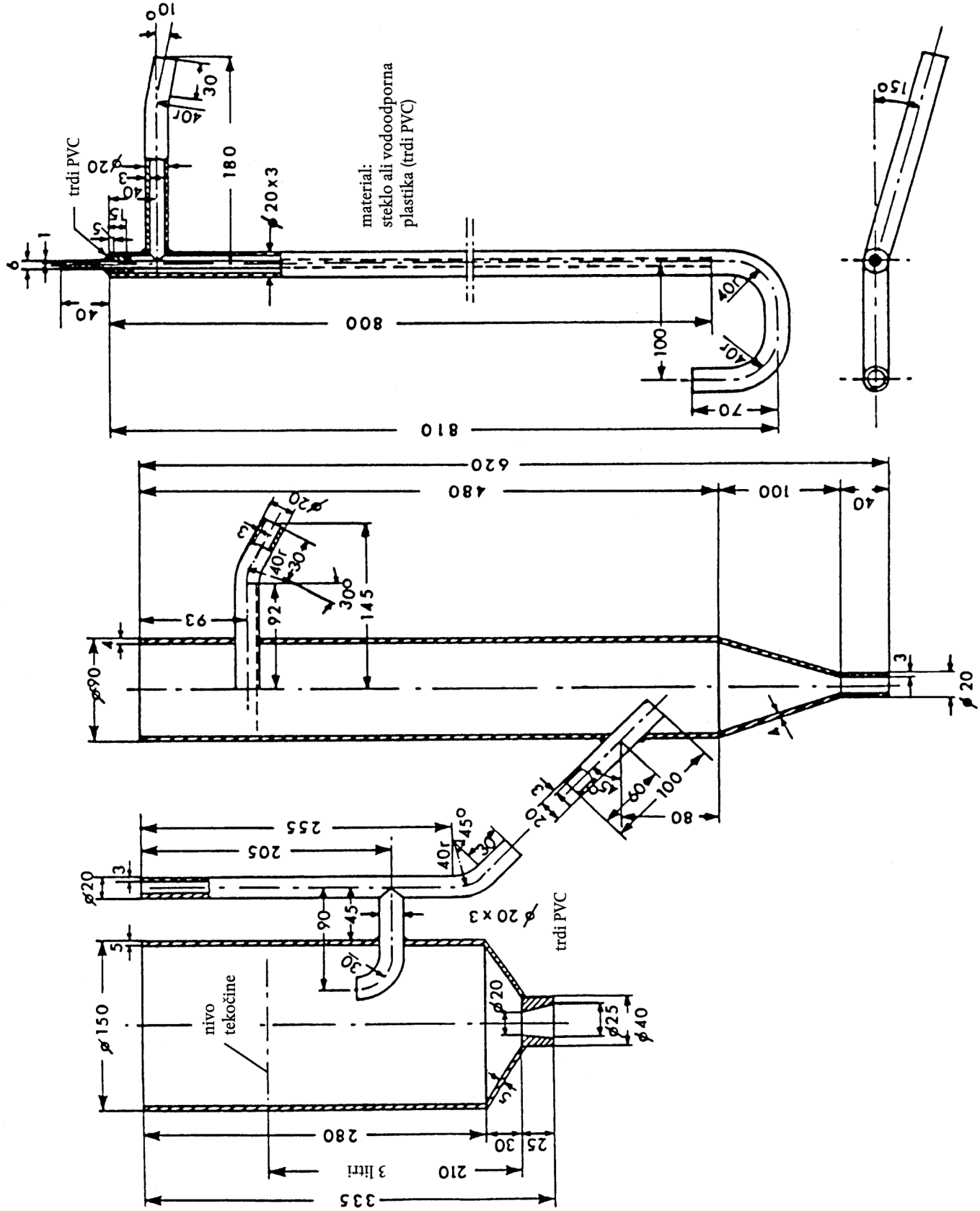
Dodatek I

Slika 1



Ključ: A: posoda za shranjevanje;
B: dozirna naprava;
C: prezračevalna komora (prostornina 3 l);
D: usedalnik;
E: air-lift;
F: zbiralnik;
G: prezračevalo;
H: merilnik pretoka zraka (poljubno).

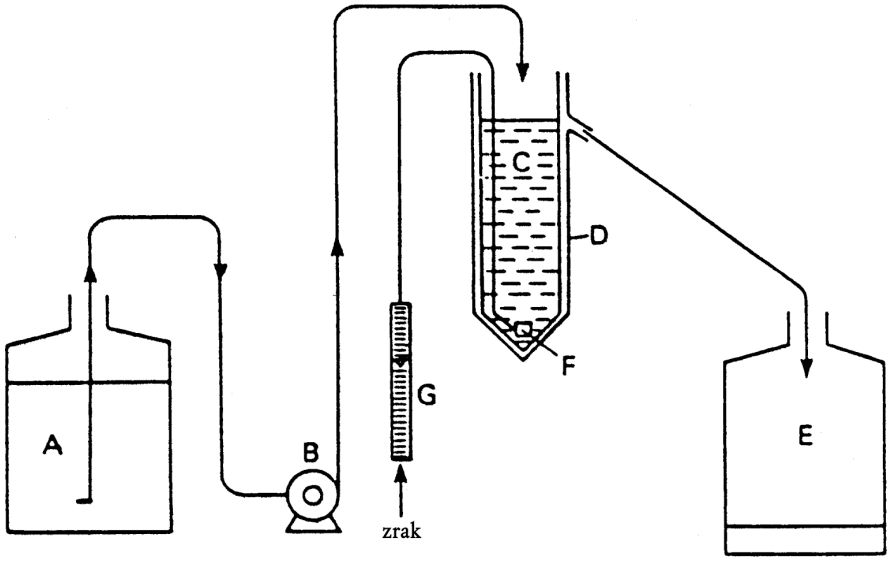
Slika 2


material:
steklo ali vodoodporna
plastika (trdi PVC)
trdi PVC
nivo
tekočine
3 litri

Dodatek 2

Slika 1

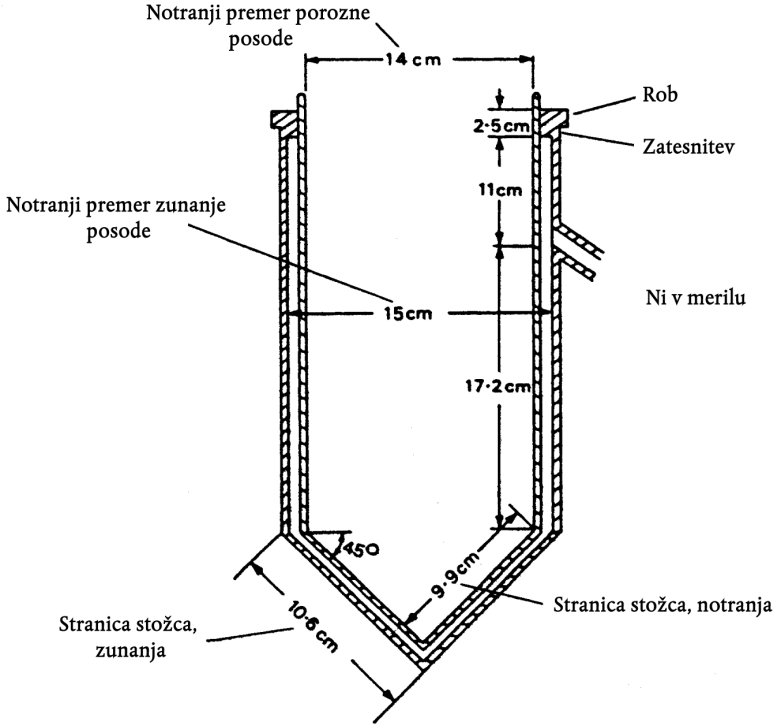
Oprema za ocenjevanje biorazgradljivosti



Ključ: A: posoda za shranjevanje;
B: dozirna črpalka;
C: porozna prezračevalna posoda;
D: zunanja neprepustna posoda;
E: posoda za zbiranje iztoka;
F: difuzor-prezračevalo;
G: rotameter (poljubno).

Slika 2

Podrobnosti o tri litrski porozni prezračevalni posodi



Dodatek 3

Delovni pogoji za simulacijski preskus z aktivnim blatom

Preveriti v vsaki skupini

Naprave

Potrditveni OECD ☐
Porozna posoda ☐

Način delovanja

Ena enota ☐
Spojeni enoti ☐
Nespojeni enoti ☐

Transinokulacija

Je ni ☐
Aktivno blato ☐
Supernatant ☐

Srednji retencijski čas

Tri ure ☐
Šest ur ☐

Osnovno hranilo

Gospodinjske odplake ☐
Sintetične odplake ☐

Inokulum

Sekundarni iztok ☐
Sestavljeni ☐
Aktivno blato ☐

Dodajanje preskusnega materiala

Od začetka ☐
Postopni porast ☐
Po nastanku blata ☐

Analiza

Specifična ☐
KPK ☐
DOC ☐

BIORAZGRADNJA

PRESKUS ZAVIRANJA DIHANJA AKTIVNEGA BLATA

1. **METODA**

1.1 **Uvod**

Opisana metoda ocenjuje učinek preskusne snovi na mikroorganizme z merjenjem stopnje respiracije pod določenimi pogoji pri različnih koncentracijah preskusne snovi.

Namen te metode je omogočiti hitro presejalno metodo, s katero je mogoče prepoznati snovi, ki bi lahko negativno vplivale na aerobne mikrobiološke čistilne naprave, ter prikazati ustrezne koncentracije preskusnih snovi, ki niso zaviralne, za uporabo v preskusih biorazgradljivosti.

Preskus za ugotavljanje območja se lahko opravi pred končnim preskusom. Z njim se pridobijo podatki o razponu koncentracij, ki se uporabijo pri glavnem preskusu.

V načrt preskusa sta vključeni dve kontroli brez preskusne snovi, ena na začetku in druga na koncu preskusnega niza. Vsako serijo aktivnega blata je treba preveriti z uporabo referenčne snovi.

To metodo se najlažje uporabi za snovi, za katere je zaradi njihove topnosti v vodi in nizke hlapljivosti verjetno, da bodo ostale v vodi.

Pri snoveh z omejeno topnostjo v preskusnem mediju verjetno ne bo mogoče določiti EC_{50}.

Rezultati, ki temeljijo na sprejemu kisika, lahko pripeljejo do napačnih zaključkov, kadar je preskusna snov nagnjena razdvojitvi oksidativne fosforilacije.

Za izvajanje preskusa je koristno razpolagati z naslednjimi podatki:

— topnost v vodi,

— parni tlak,

— strukturalna formula,

— čistost preskusne snovi.

Priporočilo

Aktivno blato lahko vsebuje potencialno patogene organizme, zato je treba z njim ravnati previdno.

1.2 **Opredelitev pojmov in enote**

Stopnja respiracije je poraba kisika mikroorganizmov odpadnih voda v aerobnem blatu, ki se na splošno izrazi kot mg O_2 na mg blata na uro.

Da se izračuna zaviralni učinek preskusne snovi pri določeni koncentraciji, se stopnja respiracije izrazi kot odstotek srednje vrednosti stopenj respiracije v dveh kontrolah:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{odstotek zaviranja}$$

pri čemer je:

R_S = stopnja porabe kisika pri preskusni koncentraciji preskusne snovi,

R_{C1} = stopnja porabe kisika, kontrola 1,

R_{C2} = stopnja porabe kisika, kontrola 2.

EC_{50} je pri tej metodi koncentracija preskusne snovi, pri kateri je stopnja respiracije 50 % tiste, prikazane v kontroli pod pogoji, opisanimi v tej metodi.

1.3 **Referenčne snovi**

Priporoča se, da se kot poznan zaviralec respiracije za referenčno snov uporabi 3,5-diklorofenol in se ga preskusi za EC_{50} na vsaki seriji aktivnega blata, s čimer se preveri, da občutljivost blata ni nenormalna.

1.4 **Princip preskusne metode**

Stopnja respiracije aktivnega blata, hranjenega s standardno količino hranil iz sintetičnih odplak, se izmeri po kontaktnem času 30 minut ali treh ur ali obeh. Prav tako se izmeri stopnja respiracije istega aktivnega blata pri različnih koncentracijah preskusne snovi v sicer identičnih pogojih. Zaviralni učinek preskusne snovi pri določeni koncentraciji se izrazi kot odstotek srednjih vrednosti stopenj respiracije v dveh kontrolah. Vrednost EC_{50} se izračuna na podlagi določitev pri različnih koncentracijah.

1.5 **Merila kakovosti**

Preskusni rezultati so veljavni, če:

— stopnji respiracije v dveh kontrolah ne razlikujeta druga od druge za več kot 15 %,

— je EC_{50} (30 minut in/ali tri ure) 3,5-diklorofenola v sprejemljivem razponu 5 do 30 mg/liter.

1.6 **Opis preskusne metode**

1.6.1 *Reagenti*

1.6.1.1 Raztopine preskusne snovi

Raztopine preskusne snovi se pripravijo sveže na začetku študije z uporabo osnovne raztopine. 0,5 % koncentracija osnovne raztopine je primerna, če se upošteva spodaj priporočen postopek.

1.6.1.2 Raztopina kontrolne snovi

Raztopino 3,5-diklorofenola je na primer mogoče pripraviti z raztopitvijo 0,5 g 3,5-diklorofenola v 10 ml 1M NaOH, redčenjem na približno 30 ml z destilirano vodo, z dodajanjem (med mešanjem) 0,5M H_2SO_4 do točke začetne precipitacije – potrebne bo približno 8 ml 0,5M H_2SO_4 –, končno z redčenjem mešanice do enega litra z destilirano vodo. Vrednost pH mora takrat biti med 7 in 8.

1.6.1.3 Sintetične odplake

Hranila iz sintetičnih odplak se naredijo z raztapljanjem naslednjih količin snovi v enem litru vode:

— 16 g peptona,

— 11 g mesnega ekstrakta,

— 3 g sečnine,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Opomba 1: Te sintetične odplake so 100-kratni koncentrat odplak, opisanih v Tehničnem poročilu OECD: „Predlagana metoda za določitev biorazgradljivosti površinsko aktivnih snovi, uporabljenih v sintetičnih detergentih“ (11. junij 1976), z dodatkom dikalijevega hidrogen fosfata.

Opomba 2: Če se pripravljeno gojišče ne uporabi takoj, ga je potrebno najdlje en teden hraniti v temi pri 0 do 4 °C v pogojih, ki ne povzročajo nikakršnih sprememb v njegovi sestavi. Gojišče se pred shranitvijo lahko tudi sterilizira, ali pa se dodata pepton in mesni ekstrakt tik pred izvajanjem preskusa. Pred uporabo se ga dobro premeša in prilagodi pH.

1.6.2 *Naprave*

Merilne naprave: natančna oblika ni ključnega pomena. Vendar pa mora biti posoda za merjenje popolnoma polna, sonda pa se mora tesno prilegati na vrat merilne posode.

Potrebna je običajna laboratorijska oprema in zlasti naslednje:

— merilna naprava,

— naprava za prezračevanje,

— pH elektroda in oprema za merjenje,

— 0_2 elektroda.

1.6.3 *Priprava inokuluma*

Za preskus se kot mikrobiološki inokulum uporabi aktivno blato iz čistilnih naprav, ki v obdelujejo predvsem gospodinjske odplake.

Če je potrebno se lahko ob prihodu v laboratorij grobi delci odstranijo s kratkotrajnim usedanjem, npr. 15 minut, in odlivanjem zgornjih plasti drobnejših trdih delcev za uporabo. Lahko pa se blato tudi nekaj sekund meša z mešalom.

Poleg tega, če se zdi, da je prisoten zaviralni material, je treba blato oprati pod vodo iz pipe ali z izotonično raztopino. Po centrifugiranju se supernatant odlije (ta postopek se trikrat ponovi).

Majhna količina blata se stehta in posuši. Na podlagi tega je mogoče izračunati količino mokrega blata, ki ga je treba suspendirati v vodi, da bi dobili aktivno blato z razponom suspendiranih trdnih snovi v suspenziji aktivnega blata od 2 do 4 g/liter. Če se upošteva spodaj priporočeni postopek, ta količina v preskusnem gojišču ustvari koncentracijo med 0,8 in 1,6 g/liter.

Če blata ni mogoče uporabiti na dan zbiranja, se 50 ml sintetičnih odplak doda vsakemu litru aktivnega blata, pripravljenega, kot je opisano zgoraj; ta se nato čez noč zrači pri 20 ± 2 °C. Zrači se še naprej za uporabo v teku dneva. Pred uporabo se po potrebi preveri in prilagodi pH na 6 do 8. V suspenziji aktivnega blata suspendirane trdne snovi je treba določiti, kot je opisano v prejšnjem odstavku.

Če je treba v naslednjih dneh uporabiti isto serijo blata (maksimalno štiri dni), se na koncu vsakega delovnega dne v liter blata doda 50 ml hranil iz sintetičnih odplak.

1.6.4 *Izvajanje preskusa*

Trajanje/kontaktni čas:	30 minut in/ali tri ure, medtem ko poteka zračenje
Voda:	Pitna voda (po potrebi brez klora)
Oskrba z zrakom:	Čisti zrak, brez olja. Pretok zraka 0,5 do 1 liter/minuto
Merilne naprave:	Bučka z ravnim dnom, kot je BPK bučka
Merilnik kisika:	Ustrezna kisikova elektroda z rekorderjem
Hranilna raztopina:	Sintetične odplake (glej zgoraj)
Preskusna snov:	Sveže pripravljena preskusna snov na začetku preskusa
Referenčna snov:	Npr. 3,5-diklorofenol (najmanj tri koncentracije)
Kontrole:	Inokulirani vzorec brez preskusne snovi
Temperatura:	20 ± 2 °C.

Predlagani preskusni postopek, ki ga je v triurnem kontaktnem obdobju mogoče upoštevati v primeru preskusne in referenčne snovi, je opisan spodaj:

Uporabi se več posod (npr. čaše s prostornino 1 litra).

Uporabiti je treba najmanj pet koncentracij, ki se med seboj razlikujejo za stalen faktor, ki po možnosti ne presega 3,2.

V času „0“ se iz 16 ml hranil iz sintetičnih odplak z vodo naredi 300 ml mešanice. Doda se 200 ml mikrobnega inokuluma, celotna mešanica (500 ml) se nato zlije v prvo posodo (prva kontrola C_1).

Preskusne posode je treba stalno prezračevati da se zagotovi, da raztopljeni O_2 ne pade pod 2,5 mg/liter in da tik pred merjenjem stopnje respiracije koncentracija O_2 znaša približno 6,5 mg/liter.

V času „15 minut“ (gre za poljuben, vendar primeren 15 minutni časovni presledek) se zgornji postopek ponovi, razen da se 100 ml osnovne raztopine preskusne snovi doda 16 ml sintetičnih odplak, še preden se doda vodo, da se dobi količina 300 ml, in mikrobni inokulum, da se dobi količina 500 ml. Ta mešanica se nato izlije v drugo posodo in zrači, kot je opisano zgoraj.Ta proces se ponovi v 15 minutnih intervalih z različnimi količinami osnovne raztopine preskusne snovi, da se dobi niz posod, ki vsebujejo različne koncentracije preskusne snovi. Na koncu se pripravi še druga kontrola (C_2).

Po treh urah se zabeleži pH, dobro premešani vzorec vsebine prve posode pa se pretoči v merilno napravo ter se v naslednjih 10 minutah meri stopnjo respiracije.

Ta določitev se opravi na vsebini vsake posode v 15 minutnih časovnih presledkih, tako da je kontaktni čas v vsaki posodi tri ure.

Referenčna snov se preskuša na enak način na vsaki seriji mikrobnega inokuluma.

Kadar je treba meritve opraviti po 30 minutah kontakta, je potreben drugačen pristop (npr. več kot en merilec kisika).

Če se zahteva merjenje kemijske porabe kisika, se pripravijo dodatne posode s preskusno snovjo, hranili iz sintetičnih odplak in vodo, vendar brez aktivnega blata. Poraba kisika se izmeri in zabeleži po 30 minutnem času prezračevanja in/ali treh urah (kontaktni čas).

2. PODATKI IN OCENA

Stopnja respiracije se izračuna na podlagi izsledkov rekorderja med približno 6,5 mg O_2/liter in 2,5 mg O_2/liter, ali v obdobju 10 minut v primeru nizke stopnje respiracije. Predel respiracijske krivulje, na kateri se meri stopnja respiracije, mora biti linearen.

Če se stopnji respiracije v dveh kontrolah razlikujeta za več kot 15 %, ali pa EC_{50} (30 minut in/ali tri ure) referenčne snovi ni v sprejemljivem razponu (5 do 30 mg/liter za 3,5-diklorofenol), je preskus neveljaven in se mora ponoviti.

Odstotek zaviranja se izračuna pri vsaki preskusni koncentraciji (glej 1.2). Odstotek zaviranja se prikaže v odvisnosti od koncentracije na log-normalnem (ali log-verjetnost) grafu, in izpelje se vrednost EC_{50}.

Z uporabo standardnih postopkov je mogoče določiti 95 % meje zaupanja za vrednosti EC_{50}.

3. POROČILO

3.1 Poročilo o preskusu

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— preskusna snov: kemijski identifikacijski podatki,

— preskusni sistem: vir, koncentracija in vsako predhodno obdelovanje aktivnega blata,

— preskusni pogoji:

  — pH reakcijske mešanice pred merjenjem respiracije,

  — temperatura med preskusom,

  — trajanje preskusa,

  — referenčna snov in njena izmerjena vrednost EC_{50},

  — abiotski sprejem kisika (če obstaja).

— rezultati:

  — vsi izmerjeni podatki,

  — krivulja zaviranja in metoda za izračun EC_{50},

  — EC_{50} in če je možno, 95 % meje zaupanja, EC_{20} in EC_{80},

  — vsa opažanja in vse deviacije od te preskusne metode, ki bi lahko vplivali na rezultat.

3.2 Razlaga podatkov

EC_{50} vrednost je treba upoštevati le kot smernico za možno strupenost preskusne snovi za aktivno blato, ki se uporablja za obdelovanje odplak ali mikroorganizme v odpadnih vodah, saj zapletenih interakcij, ki se pojavljajo v okolju, ni mogoče natančno simulirati z laboratorijskim preskusom. Poleg tega lahko preskusne snovi, ki lahko zaviralno učinkujejo na oksidacijo amoniaka, povzročijo atipične krivulje zaviranja. Glede na to je s tem je pri razlagi takšnih krivulj potrebna previdnost.

4. **VIRI**

(1) International Standard ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, str. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, str. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dreyfuss Manufacturing Industries), *Recommended Method No. 103*, prav tako opisano v:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, str. 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, str. 247.

(7) OECD, Pariz, 1981, *Test Guideline 209*, Decision of the Council C(81)30 final.

BIORAZGRADNJA

SPREMENJENI SCAS PRESKUS

1. **METODA**

1.1 **Uvod**

Namen te metode je ocena potencialne skrajne biorazgradljivosti vodotopnih, nehlapnih organskih snovi, ki so za daljši čas izpostavljene relativno visokim koncentracijam mikroorganizmov. Sposobnost preživetja mikroorganizmov se v tem obdobju ohranja z dnevnim dodajanjem hranil iz posedenih odplak. (Med vikendi je treba odplake shraniti na 4 °C. Lahko pa se uporabi sintetične odplake potrditvenega preskusa OECD.)

Lahko pride do fizikalno-kemijske adsorpcije na suspediranih trdnih snoveh, kar je treba upoštevati pri razlagi rezultatov (glej 3.2).

Zaradi dolgega obdobja zadrževanja tekoče faze (36 ur) in vmesnega dodajanja hranil, preskus ne simulira pogojev, ki so prisotni v čistilnih napravah. Pridobljeni rezultati z različnimi preskusnimi snovmi kažejo, da ima preskus visok potencial biorazgradnje.

Preskusni pogoji, so zelo ugodni za izbor in/ali prilagoditev mikroorganizmov, ki lahko razgradijo preskusno spojino. (Ta postopek je mogoče uporabiti tudi za pridobitev aklimatiziranih inokulumov za uporabo v drugih preskusih.)

Pri tej metodi se merilo koncentracije raztopljenega organskega ogljika uporablja za oceno skrajne biorazgradljivosti preskusnih snovi. Zaželena je določitev DOC po zakisanju in čiščenju, in ne kot razliko med $C_{skupni} - C_{anorganski}$.

Istočasna uporaba specifične analitske metode lahko omogoči oceno primarne razgradnje snovi (izginotje matične kemijske strukture).

Metoda se uporablja le za tiste organske preskusne snovi, ki so pri koncentracijah, uporabljenih v preskusu:

— topne v vodi (najmanj 20 mg raztopljenega organskega ogljika/liter),

— imajo zanemarljiv parni tlak,

— ne zavirajo bakterij,

— se bistveno ne adsorbirajo v preskusnem sistemu,

— se ne izgubijo iz preskusne raztopine s penjenjem.

Določiti je treba vsebnost organskega ogljika v preskusnem materialu.

Podatki o relativnih deležih glavnih sestavin preskusnega materiala bodo uporabni pri razlagi dobljenih rezultatov, zlasti v primerih, kadar so ti rezultati nizki ali obrobni.

Podatki o strupenosti snovi za mikroorganizme so lahko uporabni pri razlagi nizkih rezultatov in pri izbiri ustreznih preskusnih koncentracij.

1.2 **Opredelitev pojmov in enote**

C_T = koncentracija preskusne spojine v obliki organskega ogljika, kot je prisotna ali dodana usedenim odplakam na začetku obdobja prezračevanja (mg/liter),

C_t = koncentracija raztopljenega organskega ogljika, ugotovljenega v supernatantu v preskusni tekočini na koncu obdobja prezračevanja (mg/liter),

C_c = koncentracija raztopljenega organskega ogljika, odkritega v supernatantu kontrole na koncu obdobja prezračevanja (mg/liter).

Biorazgradnja je v tej metodi opredeljena kot izginotje organskega ogljika. Biorazgradnja se lahko prikaže z:

1. Odstotkom odstranitve D_{da} količine dnevno dodane snovi:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

pri čemer je D_{da} = razgradnja/dnevno dodajanje.

2. Odstotek odstranitve D_{ssd} količine snovi, prisotne na začetku vsakega dne:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\,(i+1)} + 3C_{c\,(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2\ (a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2\ (b)]$$

[pri čemer je D_{ssd} = razgradnja/snov na začetku dneva;

indeksa i in (i + 1) veljata za dan meritve.

Enačba 2(a) je priporočljiva, če se DOC iztoka razlikuje iz dneva v dan, medtem ko se enačbo 2 (b) lahko uporabi, kadar iztok DOC ostaja iz dneva v dan relativno konstanten.

1.3 **Referenčne snovi**

V nekaterih primerih, kadar se preiskuje nova snov, so referenčne snovi lahko uporabne; vendar pa specifične referenčne snovi tukaj niso priporočene.

Zagotovljeni so podatki o nekaj spojinah, ocenjenih s krožnimi testi (glej Dodatek 1), predvsem zaradi tega, da se lahko od časa do časa izvede umerjanje metode in da se omogoči primerjava rezultatov pri uporabi kakšne druge metode.

1.4 **Princip preskusne metode**

Aktivno blato iz čistilne naprave se prenese v polkontinuirano enoto aktivnega blata („semi-continuous activated sludge“ - SCAS). Doda se preskusna spojina in usedene gospodinjske odplake, mešanica pa se nato prezračuje 23 ur. Nato se prezračevanje ustavi, blato se pusti, da se usede, supernatanta se odstrani.

Blato, ki ostane v prezračevalnih komorah, se potem premeša z dodatnim alikvotom preskusne spojine in odplak in cikel se ponovi.

Biorazgradnja se ugotovi z določitvijo vsebnosti raztopljenega organskega ogljika v supernatantu. Ta vrednost se primerja z vrednostjo, dobljeno v supernatantu, dobljenem iz kontrole, dozirane samo s usedenimi odplakami.

Pri uporabi specifične analitske metode, se lahko izmerijo spremembe v koncentraciji matične molekule kot posledica biorazgradnje (primarna biorazgradljivost).

1.5 **Merila kakovosti**

Ponovljivost te metode, utemeljena na podlagi odstranitve raztopljenega organskega ogljika, še ni bilo določena. (Kadar naj bi šlo za primarno biorazgradnja, se zelo natančni podatki dobijo iz materialov, ki so znatno razgrajeni.)

Občutljivost metode se na splošno določi s spremenljivostjo negativne kontrole in, v manjši meri, z natančnostjo določitve raztopljenega organskega ogljika in stopnjo preskusne spojine v raztopini na začetku vsakega cikla.

1.6 **Opis preskusnega postopka**

1.6.1 *Priprave*

Uporabi se lahko zadostno število čistih prezračevalnih enot ali pa originalna 1,5 litrska preskusna enota SCAS s cevmi za dovod zraka (Slika 1) za vsako preskusno snov in kontrole. Stisnjeni zrak, ki se dovaja v preskusne enote prečiščen skozi bombažni filter, ne sme vsebovati organskega ogljika ali biti predhodno nasičen z vodo, da bi se zmanjšale izgube zaradi izhlapevanja.

Vzorec premešane suspenzije aktivnega blata, ki vsebuje 1 do 4 g suspendiranih trdnih snovi/liter, se dobi iz čistilni napravi z aktivnim blatom, ki pretežno čistijo gospodinjske odplake. Za vsako prezračevalno enoto se zahteva približno 150 ml suspenzije aktivnega blata.

Osnovne raztopine preskusne snovi se pripravijo v destilirani vodi; običajno zahtevana koncentracija je 400 mg/liter organskega ogljika, s čimer dobimo koncentracijo preskusne spojine v višini 20 mg/liter ogljika na začetku vsakega prezračevalnega cikla, v kolikor ne pride do biorazgradnje.

Višje koncentracije so dovoljene, če to strupenost za mikroorganizmov omogoča.

Izmeri se vsebnost organskega ogljika v osnovnih raztopinah.

1.6.2 *Preskusni pogoji*

Preskus je treba opraviti pri 20 do 25 °C.

Uporabi se visoka koncentracija aerobnih mikroorganizmov (od 1 do 4 g/liter suspendiranih trdnih snovi), učinkovito obdobje zadrževanja pa traja 36 ur. Karbonatni material v hranilih odplak se močno oksidira, običajno v osmih urah po začetku vsakega prezračevalnega cikla. Potem blato endogeno diha v preostalem obdobju prezračevanja, v katerem je edini razpoložljivi substrat preskusna spojina, razen če tudi ta ni že metabolizirana. Te lastnosti skupaj z vsakodnevno ponovno inokulacijo preskusa, kadar se kot gojišče uporablja gospodinjske odplake, ustvarjajo izredno ugodne pogoje tako za prilagoditev kot tudi visoke stopnje biorazgradnje.

1.6.3 *Izvajanje preskusa*

Vzame se vzorec suspenzije aktivnega blata iz čistilne naprave z aktivnim blatom za gospodinjske odplake ali pa se zame laboratorijske enote in se jih ohranja v aerobnem stanju, dokler se jih ne uporabi v laboratoriju. Vsaka prezračevalna enota, kakor tudi kontrolna enota, se napolni s 150 ml suspenzije aktivnega blata (če se uporablja originalna preskusna enota SCAS, se dana količina pomnoži z 10) in prične se prezračevanje. Po 23 urah se prezračevanje ustavi in blato se pusti, da se 45 minut useda. V tem času se odpre zamašek na vsaki posodi in se odvzame 100 ml supernatanta. Tik pred uporabo se vzame vzorec usedenih gospodinjskih odplak, 100 ml pa se doda blatu, ki ostane v vsaki prezračevalni enoti. Še enkrat se prične prezračevanje. V tej fazi se ne dodajajo nikakršni preskusni materiali, enote pa se vsak dan napolnijo z gospodinjskimi odplakami, dokler se pri usedanju ne dobi čisti supernatant. To ponavadi traja do dva tedna, v tem času pa se raztopljeni organski ogljik v supernatantu na koncu vsakega prezračevalnega cikla približa konstantni vrednosti.

Na koncu tega obdobja se premešajo posamezna usedena blata in v vsako enoto se doda 50 ml dobljenega sestavljenega blata.

Kontrolnim enotam se doda 95 ml usedenih odplak in 5 ml vode, preskusnim enotam pa 95 ml usedenih odplak plus 5 ml ustrezne preskusne spojine osnovne raztopine (400 mg/liter). Ponovno se začne prezračevanje, ki traja 23 ur. Blato se potem pusti, da se 45 minut useda, in odvzame se supernatant, ki se ga analizira za raztopljeni organski ogljik.

Zgoraj opisani postopek dodajanja in odvzemanja se ponavlja dnevno ves čas preskusa.

Pred usedanjem bo lahko treba očistiti stene enot, da bi se preprečilo kopičenje trdnih snovi nad nivojem tekočine. Za vsako enoto se uporabi drugo strgalo ali krtača, da bi se preprečile navzkrižne okužbe.

Najbolje je, da se raztopljeni organski ogljik v supernatantu določa dnevno, čeprav so dopustne tudi manj pogoste analize. Pred analizo se raztopine prefiltrirajo skozi čiste 0,45 μm membranske filtre ali pa se centrifugirajo. Membranski filtri so ustrezni, če se zagotovi, da ne prepuščajo ogljika niti absorbirajo snovi med filtracijo. Temperatura snovi ne sme presegati 40 °C, medtem ko je v centrifugi.

Trajanje preskusa v primeru spojin, ki kažejo malo ali sploh nikakršne biorazgradnje, je neomejeno, vendar je na podlagi izkušenj priporočeno, da naj na splošno preskus traja najmanj 12 in ne dlje kot 26 tednov.

2. PODATKI IN OCENA

Vrednosti raztopljenega organskega ogljika v supernatantih preskusnih in kontrolnih enot se prikažejo v odvisnosti od časa.

Ko se doseže biorazgradnja, se bo stopnja, ugotovljena v preskusu, približala stopnji, ugotovljeni v kontroli. Ko se ugotovi, da je razlika med dvema stopnjama po treh zaporednih meritvah konstantna, se določi število nadaljnjih meritev, potrebnih za omogočanje statistične obdelave podatkov, in izračuna se odstotek biorazgradnje preskusne spojine (D_{da} ali D_{ssd}, glej 1.2).

3. **POROČILO**

3.1 **Poročilo o preskusu**

Če je mogoče, se v poročilo o preskusu vključijo naslednji podatki:

— vse podatke o vrsti odplak, tipu uporabljene enote in rezultatih preskusa v zvezi s preskusno snovjo, referenčna snov, če je uporabljena, in negativna kontrola,

— temperatura,

— krivulja odstranitve z opisom, način izračunavanja (glej 1.2),

— datum in mesto vzorčenja aktivnega blata in odplak, status prilagoditve, koncentracija, itd.,

— znanstveni razlogi za vsako spremembo preskusnega postopka,

— podpis in datum.

3.2 **Razlaga rezultatov**

Ker snov, ki se preskuša s to metodo, še ne bo hitro biorazgradljiva, se bo vsaka odstranitev DOC, ki je izključno posledica biorazgradljivosti, običajno odvijala postopoma nekaj dni ali tednov, razen v tistih primerih, kjer je prilagoditev trenutna, kar se kaže z nenadnim izginotjem, ki se zgodi po nekaj tednih.

Pomembno vlogo pa lahko v nekaterih primerih odigra tudi fizikalno-kemijska adsorpcija; to se pokaže, kadar gre za celotno ali delno odstranitev dodanega DOC na samem začetku. Kaj se zgodi potem, je odvisno od dejavnikov, kot so stopnje adsorpcije in koncentracija suspendiranih trdnih snovi v zavrženem iztoku. Ponavadi razlika med koncentracijo DOC v kontrolnih in preskusnih supernatantih postopoma narašča od začetne nizke vrednosti, ta razlika pa se potem ohranja pri novi vrednosti preostali del preskusa, razen če ne pride do prilagoditve.

Če je treba določiti razliko med biorazgradnjo (ali delno biorazgradnjo) in adsorpcijo, so potrebni dodatni preskusi. To je mogoče opraviti na številne načine, najprepričljivejša pa je uporaba supernatanta ali blata kot inokuluma v preskusu iz osnovne zbirke (po možnosti v respirometričnem preskusu).

Preskusne snovi, ki v tem preskusu povzročajo visoko, neadsorptivno odstranitev DOC, je treba šteti za potencialno biorazgradljive. Delna, neadsorptivna odstranitev pomeni, da je kemikalija le izpostavljena nekakšni biorazgradnji.

Nizke ali nične odstranitve DOC lahko pomenijo, da preskusna snov zavira mikroorganizme, to pa je mogoče odkriti tudi z lizo in izgubo blata, kar povzroča motne supernatante. Preskus je treba ponoviti z uporabo nižje koncentracije preskusne snovi.

Uporaba specifične analitske metode ali preskusne snovi z oznako ^{14}C lahko omogoči večjo občutljivost. V primeru ^{14}C preskusne spojine bo predelava $^{14}CO_2$ potrdila, da je prišlo do biorazgradnje.

Kadar podani podatki veljajo za primarno biorazgradnjo, je treba, če je mogoče, razložiti spremembo kemijske strukture, ki povzroča izgubo odziva matične preskusne snovi.

Validacija analitske metode mora biti podana skupaj z odzivom, odkritim na preskusnem gojišču negativne kontrole.

4. **VIRI**

(1) OECD, Pariz, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decision of the Council C(81)30 final.

Dodatek 1

SCAS preskus: primeri rezultatov

Snov	C_c (mg/l)	$C_i - C_c$ (mg/l)	Odstotek biorazgradnje D_{da}	Trajanje preskusa (dni)
4-acetil aminobenzensulfonat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilen benzensulfonat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilen glikol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentan tetra karboksilat	17,9	3,2	81,1	120

Dodatek 2

Primer preskusne naprave

Slika 1

